# TRATAT DE MICRIOBOLIOIIE GENERALA

G. ZARNEA

# TRATAT de MICROBIOLOGIE GENERALĂ

*****

## VIROLOGIE GENERALĂ
## ANATOMIE BACTERIANĂ

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
1983

# CUPRINS


PREFAȚĂ . . . . . 13

INTRODUCERE . . . . . 15

PARTEA ÎNTÎIA

BAZELE TEORETICE ALE ECOLOGIEI MICROORGANISMELOR

ECOSISTEMELE MICROBIENE. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN ECOSISTEM 24

Arhitectura ecosistemelor microbiene. Heterogenitatea și organizarea lor spațială și temporală . . . . . 26

Ecosistemele microbiene organizate spațial . . . . . 27

Importanța heterogenității spațiale și temporale a ecosistemelor microbiene naturale . . . . . 29

Rolul microorganismelor în funcționarea ecosistemelor . . . . . 31

Colonia bacteriană ca ecosistem . . . . . 33

Sisteme coloniale în medii acvatice . . . . . 37

ADAPTAREA MICROORGANISMELOR LA ECOSISTEM . . . . . 39

Selecția micro organismelor în ecosistem . . . . . 41

CONCEPTELE DE HABITAT ȘI NIȘĂ . . . . . 43

Microhabitatul . . . . . 44

Interacțiunile dintre habitate . . . . . 46

Conceptul de nișă ecologică . . . . . 47

Compartimentul și domeniile . . . . . 49

Conceptele de compartiment și domeniu . . . . . 49

POPULAȚII ȘI COMUNITĂȚI DE MICROORGANISME . . . . . 54

Populația . . . . . 54

Comunitățile de microorganisme . . . . . 54

Componenții comunităților de microorganisme . . . . . 57

SUCCESIUNEA ECOLOGICĂ . . . . . 59

Conceptul de microorganisme-pionier . . . . . 59

Clasificarea succesiunilor . . . . . 61

Succesiunile ecologice în natură . . . . . 62


BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Succesiuni asociate cu formarea solurilor structurate . . . . . 64
Succesiunea microbiotei bucale umane . . . . . 67
Succesiunea microorganismelor în intestinul gros al șoarecilor de laborator 67
Succesiunea microorganismelor în rumen . . . . . 68
Stadiul de climax . . . . . 70

DIVERSITATEA COMUNITĂȚILOR DE MICROORGANISME . . . . . 72

**Conceptul de diversitate** . . . . . 72
Conceptul microbiologic de diversitate . . . . . 73
Conceptul ecologic de diversitate . . . . . 75
Diversitatea taxonomică . . . . . 76
Diversitatea ecologică a bacteriilor . . . . . 76
Diversitatea fiziologică a bacteriilor . . . . . 79
Diversitatea genetică a bacteriilor . . . . . 79
Semnificația studiilor de diversitate a comunităților de microorganisme 84

NUTRIȚIA ȘI CREȘTEREA MICROORGANISMELOR ÎN MEDIILE NATURALE . 86

Tipurile de nutriție a microorganismelor . . . . . 87
Prezența nutrienților în mediile naturale . . . . . 90
Microorganismele ca sursă de hrană . . . . . 93
**Creșterea microorganismelor în natură** . . . . . 96
Factorii care favorizează dezvoltarea populațiilor de microorganisme în natură . . . . . 101
Factorii care limitează creșterea populațiilor de microorganisme în natură 103

ENERGETICA ECOLOGICĂ . . . . . 106

**Rolul microorganismelor în fluxul de energie în ecosisteme. Lanțuri și rețele trofice** 106
Fluxul de energie în ecosisteme . . . . . 106
Lanțurile trofice . . . . . 108
Tipurile de lanțuri trofice . . . . . 108
Lanțul trofic fitotrof . . . . . 109
Lanțul trofic detritic . . . . . 111
Relațiile dintre nivelele trofice. Piramida numerelor . . . . . 115
Rețeaua trofică . . . . . 117
**Producție și productivitate** . . . . . 118
Producătorii primari . . . . . 123
Importanța ecologică a microorganismelor fotosintetizante ca producători primari . . . . . 126

DISEMINAREA MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ . . . . . 130

**Mobilitatea microorganismelor și taxiile** . . . . . 131
Chemotaxia . . . . . 132
Mecanotaxiile 138 ✧ Fototaxia 138 ✧ Aerotaxia 140 ✧ Viscotaxia 141 ✧ Termotaxia 141 ✧ Magnetotaxia 138 Semnificația ecologică a diferitelor taxii . . . . . 145
Homotaxia . . . . . 146

INFLUENȚA INTERFEȚELOR ASUPRA MICROORGANISMELOR. BIOFILMELE MICROBIENE . . . . . 154

Mecanismele aderiunii bacteriilor . . . . . 155
Particularitățile activității microorganismelor aderente de substrate . . 158

BCU ALEXANDRU IOAN CUZA UNIVERSITY LIBRARY

Importanța ecologică . . . . . 160
Placa dentară ca ecosistem . . . . . 162

**INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE MEDIU. MICROORGANISMELE EXTREMOFILE** . 169

**Temperatura** . . . . . 169
Temperatura de dezvoltare . . . . . 170
Microorganismele termofile . . . . . 174
Bacteriile hipertermofile . . . . . 177
Microorganismele psichrofile . . . . . 178
**Apa. Presiunea osmotică** . . . . . 182
Presiunea osmotică . . . . . 184
Mecanismele de reglare osmotică la bacterii. Suprafețele osmoprotectoare 188
**Presiunea hidrostatică. Microorganismele barofile** . . . . . 191
**Salinitatea. Microorganismele halofile** . . . . . 193
**Aciditatea și alcalinitatea** . . . . . 197
Microorganismele alcalifile . . . . . 198

**VIABILITATEA, SUPRAVIEȚUIREA ȘI LONGEVITATEA MICROORGANISMELOR** . 202

**Viabilitatea microorganismelor** . . . . . 202
**Supraviețuirea microorganismelor** . . . . . 203
Rolul metabolismului endogen în supraviețuire . . . . . 206
Mecanisme genetice asociate cu supraviețuirea la înfometare . . . . . 213
**Longevitatea sporilor** . . . . . 215

**CUANTIFICAREA PREZENȚEI ȘI ACTIVITĂȚII MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ** 221

Examinarea directă a bacteriilor în mediile naturale . . . . . 223
Determinarea biomasei microorganismelor . . . . . 230
Determinarea unor componenți chimici specifici ai comunităților de microorganisme . . . . . 234
Activitatea metabolică . . . . . 236
Relevanța datelor de laborator pentru realitățile din natură . . . . . 245
Modelarea în ecologia microorganismelor . . . . . 247

**INTERACȚIUNILE DINTRE POPULAȚIILE DE MICROORGANISME** . . . . . 253

**Interacțiuni pozitive** . . . . . 255
Comensalismul . . . . . 256
Protocooperarea . . . . . 257
Sinergismul . . . . . 258
Mutualismul . . . . . 260
Sintrofia . . . . . 263
**Interacțiuni negative** . . . . . 265
Competiția . . . . . 265
Amensalismul . . . . . 269
Antibioza . . . . . 270
**Interacțiuni genetice în mediile naturale** . . . . . 275
Genomul, component al ecosistemului . . . . . 275
Transferul de gene la bacterii în natură . . . . . 278

**SIMBIOZA** . . . . . 287

Condițiile de instalare a simbiozelor . . . . . 288
Reglarea interacțiunilor simbiotice . . . . . 291

BCUA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Adaptări consecutive simbiozei . . . . . 293
Evoluția simbiozelor . . . . . 294
Semnificația biologică a simbiozelor . . . . . 297
Semnificația ecologică a simbiozelor . . . . . 299
**Simbioza microorganisme fototrofe — nevertebrate** . . . . . 302
Endosimbionții bacterieni ai protozoarelor . . . . . 310
**Simbioza microorganisme — insecte** . . . . . 312
**Simbioza bacteriilor luminescente cu moluștele și cu pești** . . . . . 323
**Simbiozele fixatoare de azot molecular. Simbioza *Rhizobium* — plante leguminoase** 326
Infectarea plantelor-gazdă . . . . . 329
Formarea nodozităților . . . . . 338
Morfologia nodozităților . . . . . 341
Fiziologia simbiozei . . . . . 343
Bazele genetice ale simbiozei diazotrofe . . . . . 345
Originea și evoluția simbiozei diazotrofe . . . . . 351
Simbioza *Rhizobium* — leguminoase tropicale . . . . . 352
Simbiozele asociative. Fixarea azotului în rizosferă . . . . . 353
Simbiozele foliare producătoare de nodozități . . . . . 355
Actinorizele. Simbioza *Frankia* — angiosperme — neleguminoase . . . . 356
Cianobacterii fixatoare de azot . . . . . 363
Simbioza *Azola* — *Anabaena azollae* . . . . . 363

**MICORIZELE** . . . . . 367

**Ectomicorizele** . . . . . 369
Modul de formare a ectomicorizelor . . . . . 370
Particularitățile anatomice ale ectomicorizelor . . . . . 371
Relația structurală dintre fungi și planta-gazdă în ectomicorize . . . . 372
Condițiile pentru formarea ectomicorizelor . . . . . 374
**Endomicorizele. Micorizele veziculo-arbusculare** . . . . . 375
Formarea micorizelor veziculo-arbusculare . . . . . 377
Micorizele orhideelor . . . . . 380
Micorizele ericoide . . . . . 380
Micorizele ectoendotrofe . . . . . 381
Micorizele peritrofe . . . . . 381
Rolul micorizelor în biologia plantelor . . . . . 382
**Ecologia micorizelor** . . . . . 390

**SIMBIOZA CIANOBACTERII — FUNGI SAU ALGE — FUNGI. LICHENII** . . . . 392

Relațiile fizice dintre simbionți . . . . . 398
Relațiile fiziologice dintre simbionți . . . . . 399
Semnificația biologică . . . . . 405

**PARAZITISMUL** . . . . . 409

**Parazitismul intracelular** . . . . . 410
Tipurile de parazitism intracelular . . . . . 411
Pătrunderea microorganismelor parazite în celulele-gazdă . . . . . 414
Multiplicarea paraziților intracelulari . . . . . 416
Eliberarea paraziților intracelulari . . . . . 417
Apariția parazitismului intracelular . . . . . 418

BCU IAȘI CENTRU PATRIMONIU LIBRARY

Evoluția parazitismului intracelular la bacterii . . . . . 419
Parazitismul asociat cu transferul nuclear . . . . . 421
Parazitismul absolut . . . . . 422
Parazitismul genetic . . . . . 423
**Micoparazitismul** . . . . . 423

**PRĂDAREA** . . . . . 429
**Procariotele prădătoare** . . . . . 431
Prădarea extracelulară . . . . . 432
Prădarea intracelulară . . . . . 433
Bacteriile prădătoare periplasmatice. *Bdellovibrio* sp. . . . . 433
Bacteriile prădătoare citoplasmatice . . . . . 436
Fungii nematofagi . . . . . 438
Semnificația ecologică a prădării . . . . . 440
Interacțiuni litice . . . . . 443
Liza fagică . . . . . 444
Bacteriile „bacteriofage" . . . . . 446

**MICROORGANISMELE PATOGENE** . . . . . 451
**Patogenitatea** . . . . . 451
**Virulența** . . . . . 453
Măsurarea virulenței . . . . . 453
**Aderența bacteriilor de celulele organismului-gazdă** . . . . . 464
Bazele genetice ale virulenței bacteriilor . . . . . 476
**Variația antigenică** . . . . . 480
**Microorganismele oportuniste** . . . . . 485

**TOXINELE BACTERIENE** . . . . . 490
**Clasificarea toxinelor** . . . . . 490
Toxicitatea . . . . . 493
**Exotoxinele bacteriene** . . . . . 495
Toxina difterică . . . . . 500
Toxina holerică . . . . . 505
Toxina Shiga . . . . . 511
Toxina tetanică . . . . . 513
**Toxinele intracelulare. Endotoxinele bacteriene** . . . . . 521
Structura lipopolizaharidelor . . . . . 523
**Toxinele citolitice bacteriene** . . . . . 529
**Toxinele cristalizate de la *Bacillus thuringiensis*** . . . . . 532
Microorganismele ca agenți de combatere biologică a artropodelor . . . 541
**Fitotoxinele de natură bacteriană** . . . . . 547

## PARTEA A DOUA

## MICROORGANISMELE ȘI MEDIILE LOR NATURALE

**ECOSFERA** . . . . . 553
**ATMO-ECOSFERA CA HABITAT ȘI MEDIU MAJOR PENTRU RĂSPÎNDIREA MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ** . . . . . 558
**Atmosfera ca habitat pentru microorganisme** . . . . . 560
Sistemele de „nori" microbieni atmosferici . . . . . 561

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mecanisme de diseminare a fungilor . . . . . 563
**Dispersarea microorganismelor la distanță pe calea aerului** . . . . . 566
**Rolul aerului în transmiterea microorganismelor patogene pentru om** . . . . . 568
Mecanisme de eliminare a microorganismelor din atmosferă . . . . . 572

**MICROBIOLOGIA SPAȚIULUI COSMIC** . . . . . 575
**SOLUL CA MEDIU NATURAL PENTRU MICROORGANISME. STRUCTURA ȘI DINAMICA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME DIN SOL** . . . . . 583

**Formarea solului** . . . . . 587
Textura solului . . . . . 588
Structura solului . . . . . 590
Orizonturile genetice și profilurile solului . . . . . 596
Funcțiile ecologice ale solului . . . . . 600
**Humusul** . . . . . 606
Humificarea . . . . . 609
Rolul humusului în natură . . . . . 611
**Microbiota din sol** . . . . . 617
Bacteriile . . . . . 620
Fungii . . . . . 625
Algele . . . . . 628
Protozoarele . . . . . 629
Starea de latență a microorganismelor în sol . . . . . 632
Descompunerea resturilor vegetale în sol . . . . . 633
**Interacțiuni microorganisme — plante** . . . . . 636
Interacțiuni între rădăcinile plantelor și microorganismele din sol. Rizosfera 637
Efectul rădăcinilor asupra populațiilor de microorganisme din rizosferă 640
Efectele microorganismelor asupra plantelor . . . . . 645
Interacțiunile microorganismelor cu nevertebratele din sol . . . . . 651
Interacțiunea microorganismelor cu structurile aeriene ale plantelor . . . 651
**Implicații practice ale activității microorganismelor din sol** . . . . . 655

**HIDROECOSFERA. STRUCTURA ȘI DINAMICA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME DIN APE** . . . . . 665
**Caracterizare generală a mediilor acvatice** . . . . . 665
Prezența microorganismelor în apele naturale . . . . . 666
Factorii fizici și chimici care influențează natura și activitatea microorganismelor din mediile acvatice . . . . . 667
**Microbiota apelor curgătoare** . . . . . 681
Microbiota izvoarelor . . . . . 681
Microbiota riurilor . . . . . 682
**Lacurile, medii naturale pentru microorganisme** . . . . . 684
Microbiota lacurilor . . . . . 694
Comunitățile de microorganisme fotosintetizante din ecosistemele acvatice 698
Habitate și comunități specifice microbiotei acvatice . . . . . 698
Activitatea microorganismelor în sedimentele acvatice . . . . . 706
Eutrofizarea . . . . . 708
**Microbiota apelor subterane** . . . . . 712
Apele subterane ca ecosistem . . . . . 717
**Marea ca mediu natural pentru microorganisme** . . . . . 717
Microbiota marină . . . . . 721

BCU IAȘI CENTRU UNIVERSITY LIBRARY

Degradarea substanțelor organice în oceane . . . . . 727
Estuarele ca medii naturale pentru microorganisme . . . . . 731
**Rolul microorganismelor în bazinele acvatice naturale** . . . . . 732
**Ecologia surselor hidrotermale submarine** . . . . . 736
Microbiota ecosistemelor hidrotermale . . . . . 739
Ecologia comunităților hidrotermale submarine . . . . . 743

**MICROBIOTA NORMALĂ A ORGANISMELOR ANIMALE** . . . . . 748

**Colonizarea și succesiunea microorganismelor la om** . . . . . 749
Habitatele microbiotei gastrointestinale . . . . . 751
Rolul fiziologic al microbiotei gastrointestinale . . . . . 756
Microbiota altor suprafețe ale organismului uman sănătos . . . . . 766
**Microbiota din rumen** . . . . . 767
Dezvoltarea ecosistemului ruminal . . . . . 776
Microorganismele probiotice . . . . . 776
**Gnotobioza și animalele gnotobiotice** . . . . . 781
Caracteristicile animalelor „germ-free" . . . . . 782

**ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN CIRCUITUL GLOBAL AL MATERIEI ÎN NATURĂ** 790

**Circuitul biogeochimic al azotului** . . . . . 793
**Fixarea biologică a azotului** . . . . . 796
Perspectivele îmbunătățirii procesului de fixare biologică a azotului . . . 805
**Mineralizarea azotului organic din sol. Amonificarea** . . . . . 806
Nitrificarea . . . . . 810
Denitrificarea . . . . . 812
**Circulația oxigenului** . . . . . 819
**Circulația carbonului în natură** . . . . . 823
Circulația carbonului în mediile acvatice . . . . . 827

**DEGRADAREA BIOLOGICĂ A CONSTITUENȚILOR VEGETALI** . . . . . 830

**Degradarea biologică a celulozei** . . . . . 831
Microorganismele celulozolitice . . . . . 835
Degradarea enzimatică a celulozei . . . . . 836
Celulosomii și policelulosomii . . . . . 839
**Degradarea microbiană a hemicelulozelor** . . . . . 841
**Degradarea microbiană a lignineI** . . . . . 843
Microorganismele care degradează lignina . . . . . 845
Conceptul de „combustie enzimatică" . . . . . 852

**Chitina și microorganismele chitinolitice** . . . . . 854

**Scoaterea din circulație a carbonului organic sau anorganic** . . . . . 856
Influența activităților umane . . . . . 858

**Circulația monooxidului de carbon** . . . . . 859

**Circulația fosforului în natură** . . . . . 862

**Circulația sulfului în natură** . . . . . 869
Originea compușilor sulfului în atmosferă . . . . . 871
Mineralizarea compușilor organici ai sulfului . . . . . 876
Ciclul sulfului în mediile acvatice . . . . . 880

**Circulația elementelor toxice în natură** . . . . . 885
Interconversiunile microbiene ale metalelor grele . . . . . 887
Ciclul cobaltului în natură . . . . . 890

BCU UNIVERSITY LIBRARY

Metilarea arsenicului . . . . . 892
Detoxifierea compușilor cromului . . . . . 893

**ACTIVITATEA GEOLOGICĂ A MICROORGANISMELOR** . . . . . 896

**Transformările microbiene ale mineralelor** . . . . . 896
**Transformările microbiene ale fierului și manganului** . . . . . 900
Transformările microbiene ale manganului . . . . . 904
**Recuperarea metalelor prin acumulare de către microorganisme** . . . . . 908
**Rolul microorganismelor în geneza și diageneza rocilor *in situ*** . . . . . 913
Geneza biologică a rocilor carbonatate . . . . . 914
Rolul microorganismelor în geneza stromatoliților . . . . . 916
**Rolul microorganismelor în formarea zăcămintelor de petrol** . . . . . 919
Originea zăcămintelor de petrol . . . . . 919
Argumente în favoarea originii biogene a petrolului . . . . . 920
**Rolul microorganismelor în formarea turbei și a zăcămintelor de cărbuni** . . . 927
**Rolul microorganismelor în formarea depozitelor de sulf** . . . . . 929
**Rolul bacteriilor în formarea zăcămintelor de nitrați** . . . . . 932

**BIODEGRADAREA ȘI BIODETERIORAREA MICROBIANĂ** . . . . . 936

**Activitatea microorganismelor asupra hidrocarburilor** . . . . . 941
**Biodegradarea țițeiului** . . . . . 941
Degradarea hidrocarburilor din petrol în natură . . . . . 942
Biodegradarea hidrocarburilor din țiței în sol . . . . . 942
Microorganismele care degradează hidrocarburile . . . . . 946
Biodegradarea stimulată a țițeiului . . . . . 950
Construcția de bacterii cu proprietăți degradative superioare . . . . . 952
**Biodeteriorarea cauciucului** . . . . . 955
**Biodeteriorarea vopselelor** . . . . . 957
**Alterarea microbiană a suprafețelor de sticlă** . . . . . 957
**Degradarea țesuturilor vegetale asociată cu termogeneza microbiană** . . . . . 958
**Rolul microorganismelor în degradarea rocilor *in situ*** . . . . . 960
**Coroziunea bacteriană a metalelor** . . . . . 964
**Biosolubilizarea metalelor. „Leșierea" bacteriană** . . . . . 970
Microorganismele active în biosolubilizare . . . . . 970
Mecanismele biosolubilizării . . . . . 972
**Degradarea microbiană a substanțelor xenobiotice** . . . . . 976
Efectele ecologice ale substanțelor xenobiotice . . . . . 979
Degradarea compușilor xenobiotici . . . . . 982
Degradarea completă a substanțelor xenobiotice sub acțiunea unor asociații de microorganisme . . . . . 987
Bazele genetice ale degradării compușilor organici halogenați . . . . . 991

**MICROBIOLOGIA APELOR REZIDUALE** . . . . . 1002

**Microbiota apelor uzate** . . . . . 1003
**Microbiologia tehnologiilor de tratare aerobă** . . . . . 1006
Filtrele biologice . . . . . 1006
Microbiologia nămolului activat . . . . . 1012
Iazurile biologice de stabilizare sau de oxidare . . . . . 1020
**Microbiologia tehnologiilor de tratare anaerobă** . . . . . 1020
Îndepărtarea compușilor azotului prin nitrificare și denitrificare bacteriană 1030
**Autoepurarea apelor poluate** . . . . . 1036

**BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ** . . . . . 1044

BCU IAȘI - DIGITAL LIBRARY

# PREFAȚĂ

*Volumul al cincilea al* Tratatului de microbiologie generală *cu tema „Ecologia microorganismelor. Microorganismele și mediile lor naturale" reprezintă o încercare de a sintetiza, într-o concepție integratoare, principalele aspecte fundamentale și aplicative, decurgînd din răspîndirea, activitatea și rolul microorganismelor în natură.*

*— Prezentarea într-un cadru conceptual larg, corespunzător orientărilor pe plan internațional, a cîtorva probleme esențiale ale Ecologiei microorganismelor, incluzînd: bazele teoretice, interacțiunile dintre microorganisme în natură, dintre micro- și macroorganisme, precum și dintre microorganisme și mediul neanimat. În acest context, sînt prezentate selectiv unele probleme de microbiologia solului, microbiologia apelor dulci și marine, de geomicrobiologie și microbiologia petrolului, de patogenitate și toxigeneză, rolul microorganismelor în circuitul elementelor biogene în natură, în biodegradare, biodeteriorare etc.*

*— Al doilea obiectiv a fost reprezentat de încercarea de a pune în acord observațiile decurgînd din studiul activității și rolului microorganismelor în natură cu principiile și conceptele Ecologiei generale.*

*Cum înțelegerea interacțiunilor dintre microorganisme și a relațiilor lor cu mediul ambiant implică frecvent abordarea unor probleme de fiziologie și biochimie celulară sau de biologie moleculară am recurs cel mai adesea la trimiteri la volumele anterioare sau am inserat datele publicate ulterior apariției acestora.*

*În elaborarea acestei lucrări — prima de acest gen în literatura de specialitate din țara noastră și, în același timp, una dintre cele cîteva existente pe plan internațional — am avut de învins unele dificultăți majore decurgînd în special din stadiul actual de evoluție al Ecologiei microorganismelor.*

*Cea mai importantă decurge din contradicțiile mari și frecvente dintre conceptele Ecologiei generale și cele vehiculate în lucrările de Ecologia microorganismelor. Unele dintre ele au fost semnalate în cursul lucrării și decurg, în mod evident, din dificultatea de a extrapola conceptele formulate pe baza observațiilor efectuate asupra unor organisme evoluate (plante și animale), care sînt greu de conciliat cu particularitățile biologice ale unei lumi atît de diferite cum este cea a microorganismelor. Este probabil că evoluția Ecologiei microorganismelor va atenua aceste contradicții sau va permite statuarea unor concepte și principii călăuzitoare proprii, adaptate acestui domeniu.*

*Contradicțiilor conceptuale li s-au adăugat și alte dificultăți:*

*1) cele mai multe date privind activitățile și comportamentul microorganismelor sînt obținute prin studii de laborator. Ca urmare, extrapolarea lor la condițiile naturale trebuie făcută cu maximă prudență;*

*2) diferențele mari dintre estimările cantitative, rezultînd nu numai din diversitatea mediilor naturale, ci și din fiabilitatea redusă a tehnicilor de lucru din Ecologia microorganismelor;*

*3) folosirea unei terminologii plină de ambiguități și acordarea statutului de sinonimie unor termeni, prin definiție diferiți;*

*4) dificultăți legate de opțiunea diferiților autori (mai ales din domeniul micologiei și botanicii) pentru sisteme de clasificare diferite;*

*5) practica autorilor de limbă engleză de a menționa numai numele vernacular al diferitelor organisme, fără a preciza denumirea științifică a speciilor studiate etc.*

*Succesiunea diferitelor capitole este rezultatul unei opțiuni subiective dificile, multe probleme putînd fi abordate în mai multe secțiuni ale lucrării. Astfel, fixarea biologică a azotului este prezentată în capitolul consacrat simbiozei, interacțiunilor dintre microorganisme și plante, cît și în cele referitoare la microbiota din sol, din mediile acvatice și la circulația elementelor biogene în natură.*

*În mod similar, degradarea microbiană a celulozei este asociată cu procesele ce asigură circulația carbonului în natură, cu cele referitoare la microbiota din sol, cu microbiota din rumen (materialele celulozice ca sursă de C și de energie), cu tratarea anaerobă a apelor reziduale (și producerea de metan), cu microbiota sistemelor estuarine și marine, și cu biodeteriorarea lemnului sau a altor substraturi celulozice.*

*Solul, apele dulci și marine sînt reprezentate ca medii specifice, în timp ce aerul este asociat, în special, cu rolul său în dispersarea microorganismelor.*

*Încheind acest volum, îmi îndeplinesc o plăcută îndatorire mulțumind colegului meu acad. N. Boțnariuc, pentru orele numeroase de discuții interesante și pentru informațiile furnizate, care au avut un rol benefic în realizarea acestei lucrări.*

*Sînt în mod deosebit îndatorat prietenului meu, prof. dr. Alexandre Sasarman (Universitatea Montréal, Canada) pentru sprijinul deosebit acordat în obținerea celor mai noi lucrări de specialitate.*

*De asemenea, mulțumesc colegilor prof. dr. Marin Andrei, Aurelia Brezeanu, Ion Cristurean și Irina Teodorescu pentru promptitudinea cu care au răspuns interesului meu pentru unele probleme din domeniul specialității lor.*

*Lucrarea a beneficiat de ajutorul dat cu inteligență și seriozitate de Aura Georgeta Vasile și de talentul și strădania doamnei grafician Georgeta Dura, care a realizat ilustrația.*

*Ca și în cazul volumelor precedente, îmi îndeplinesc, de asemenea, o plăcută îndatorire, exprimîndu-mi întreaga gratitudine față de colaboratoarea mea, doamna dr. Lucia Dumitru. Fără sprijinul său, acordat cu răbdare, deosebită competență și devotamentul demonstrat pe tot parcursul lucrării, acest volum nu ar fi putut apărea.*

*În încheiere, mulțumind colegilor care au apreciat primele patru volume ale acestei lucrări, îmi exprim speranța că volumul actual — care încearcă să prezinte cîteva probleme esențiale de Ecologia microorganismelor și să ilustreze stadiul actual al acestui domeniu — va fi util celor interesați de problematica respectivă. Ca și în cazul volumelor anterioare, cu acest gînd, voi primi cu recunoștință orice observație directă, colegială, privind structura și conținutul acestei lucrări.*

*AUTORUL*

# INTRODUCERE

Ecologia microorganismelor este unul dintre domeniile cele mai noi ale științelor microbiologice.

Prima încercare de sinteză și de punere în acord a datelor disparate de microbiologie a mediului cu conceptele de bază ale Ecologiei generale, datorită lui T. D. Brock, datează din anul 1966, iar din anul 1971, cea a lui Alexander. Au urmat, pînă în prezent, încă patru sau cinci lucrări de sinteză pe plan mondial.

Situația este oarecum paradoxală, deoarece preocupările de acest gen au antedatat cu mult apariția Ecologiei microorganismelor ca știință. Ceva mai mult, demonstrarea rolului ecologic al microorganismelor (transformarea substanțelor organice și anorganice în sol, în apă și în sedimente, fermentațiile, bolile infecțioase etc.) au dat naștere microbiologiei ca știință experimentală.

Chiar descoperirea microorganismelor (bacterii, fungi, alge, protozoare) cu ajutorul unui microscop rudimentar de către Leeuwenhoek (1675) a fost făcută prin evidențierea prezenței lor în diferite medii naturale (ape de canal, salivă, puroi etc.).

Epoca pasteuriană a fost marcată de demonstrația categorică a faptului că mediul extern (aerul atmosferic) este sursă de microorganisme (în studiile referitoare la generația spontană), de rolul microorganismelor specifice și al celor străine în transformarea unor substanțe organice prin fermentație, de particularitățile biologice ale microorganismelor patogene și de posibilitatea modificării unor proprietăți esențiale ca virulența virusurilor și a bacteriilor sub influența condițiilor de mediu.

Unele procese microbiene cu importanță majoră pentru mediile naturale, ca, de exemplu, reducerea nitraților a fost descrisă de Schonbein, încă din anul 1868, iar nitrificarea în anul 1879, cînd Schloesing și Müntz au evidențiat oxidarea amoniacului din apa de canal la nitrat, cînd trece printr-o coloană de nisip. Natura biologică a procesului a fost demonstrată prin suprimarea lui în urma tratării cu cloroform și restabilirea după inocularea cu sol normal.

Beijerinck (1851—1935), descoperitorul virusurilor, care a studiat, între altele, microorganismele fixatoare de azot, a abordat cel dintîi în mod deliberat relația microorganisme/mediu, descriind procesul „abordării ecologice". Cu ocazia studiului bacteriilor ureolitice, a propus tehnica îmbogățirii mediului de cultură pentru a crea condiții adecvate selecționării anumitor microorganisme din mediu. El a demonstrat că degradarea unor compuși

organici este realizată adesea mai ușor de o comunitate de microorganisme decît de o specie individuală, fapt confirmat de studiile actuale privind degradarea substanțelor complexe rezistente sau „recalcitrante".

Winogradsky (1856—1953) a pus bazele Microbiologiei solului, stabilind tehnici specifice de cercetare, caracterizînd solul din punct de vedere ecologic și demonstrînd semnificația diferită a microorganismelor autohtone („permanente", „indigene") față de cele alohtone („temporare", „zimogene") etc.

Studiile analitice efectuate de un număr mare de cercetători în primele cinci decenii ale secolului XX au vizat stabilirea rolului microorganismelor din diferite medii naturale (sol, ape dulci și marine, sedimente, zăcăminte etc.) și au permis și unele generalizări privind rolul microorganismelor în productivitatea biologică a mediilor respective, în circulația biogeochimică a elementelor, în degradarea unor substanțe complexe etc.

Microbiologia medicală umană și veterinară, precum și patologia plantelor au studiat relațiile microorganismelor patogene cu organismele-gazdă, supraviețuirea și condițiile de transmitere în natură, influența factorilor din mediu, mecanismele moleculare de acțiune, precum și reacția gazdelor față de agresiune.

În aceste condiții s-au dezvoltat o serie de discipline individuale (microbiologia solului, microbiologia acvatică, geomicrobiologia, microbiologia medicală etc.), cu tehnici specifice, care au acumulat fapte de importanță fundamentală și practică, dar cu concepte și terminologii proprii, ceea ce a accentuat caracterul autonom al unor domenii în realitate interconectate. Ele vor continua să existe și să se dezvolte corelat și condiționat de exigențele teoretice și practice ale domeniilor respective.

În timp ce domeniile implicate în patologia umană, animală sau a plantelor vor continua un demers *autecologic*, raportat la relația dintre un anumit microorganism și mediul său, studiile referitoare la alte medii naturale (sol, ape dulci și marine etc.) vor avea, prin definiție, un caracter pronunțat *sinecologic* decurgînd din necesitatea descifrării relațiilor dintre organismele care formează o comunitate biologică într-un singur loc și mediul său natural.

Ecologia microorganismelor a apărut ca un domeniu al microbiologiei generale, cu caracter larg, integrator, interdisciplinar, strîns legat de microbiologie, ca și de ecologie. Ea aplică datele și conceptele microbiologiei generale (biochimia, fiziologia, sistematica, genetica microorganismelor etc.) la studiile privind prezența naturală a microorganismelor și interacțiunile dintre ele cu alte organisme și cu mediul înconjurător.

În consecință, Ecologia microorganismelor sau Microbiologia mediului, după terminologia propusă de Jannasch (1984), urmărește studiul integrat al relațiilor biologice dintre microorganismele prezente într-un habitat comun și interacțiunile care apar între componenții biotici și abiotici.

În concepția modernă, formulată inițial de Alexander (1971), însușită de majoritatea specialiștilor „cîmpul ecologiei microorganismelor se extinde dincolo de mediile naturale de tipul solului, apelor etc. și include probleme ca infecțiile și bolile produse de microorganismele patogene, contaminarea alimentelor prelucrate, a apelor reziduale, tratarea apelor uzate, epurarea apei potabile și chiar cercetarea vieții extraterestre, pentru a numi numai cîteva" (Karl, 1980). Din această formulare rezultă că deși interesul pri-

mordial a fost inițial legat de microbiologia ecosistemelor naturale, el s-a extins și la zonele „perturbate", începînd cu cele supuse agriculturii intensive, poluării apelor, precum și asupra celor controlate sau expuse activităților perturbatoare umane. Apariția tardivă a Ecologiei microorganismelor ca știință a avut la bază o serie de condiții specifice. Prezentarea sintetică a cîtorva, mai importante, este interesantă pentru că evidențiază unele particularități ale domeniului. Ele includ:

— Biodiversitatea imensă a unui obiect de studiu greu de evidențiat, de identificat și de cuantificat în condiții naturale, imensa versatilitate metabolică, localizarea în habitate micrometrice sau milimetrice, cel mai adesea cu proprietăți fizico-chimice foarte diferite de macromediul din care sînt preluate, adaptabilitatea la condiții foarte diferite de cele uzuale și, uneori, un grad mare de supraviețuire.

— Caracterul contradictoriu al rezultatelor obținute în studiul microorganismelor din mediile naturale (morfologie diferită, cuantificări populaționale nereproductibile, multiplicare lentă sau prezența unor forme de supraviețuire incapabile de multiplicare *in vitro* etc.) nu au stimulat implicarea unui specialist acomodat încă de la începutul formării sale cu studiul culturilor pure, în condiții de laborator.

— După cum remarcă Brock (1969): „există o tendință naturală a specialiștilor în Ecologia microorganismelor de a urma o cale ușoară și de a sta în laborator". Fără a contesta valoarea excepțională a cercetărilor de laborator, care au făcut din microbiologie unul dintre domeniile cele mai dinamice ale științelor biologice și impactul lor considerabil asupra altor discipline (biochimie, biologie și fiziologie celulară, genetică și inginerie genetică, imunobiologie etc.), a devenit evident că ele sînt efectuate în condiții pe care microorganismele nu le întîlnesc niciodată în natură.

Încercarea de a le reproduce în laborator este imposibilă, pentru că este imposibil de reprodus marea complexitate fizico-chimică a mediilor naturale (cum este, spre exemplu, solul) în care microorganismele sînt integrate în comunități complexe, dinamice, care interacționează uneori temporar și aleatoriu, alteori riguros obligate, rareori neutre, cel mai adesea influențîndu-se în sens favorabil sau negativ.

— După Atlas și Bartha (1987), unul din factorii obiectivi care au îndepărtat pe microbiologi de domeniul Ecologiei microorganismelor este caracterul interdisciplinar al acesteia. El implică nu numai conexiunile de bază cu Microbiologia generală și cu Ecologia, ci și cu Biologia generală, Botanica, Zoologia, Știința solului, Limnologia, Oceanografia, Fizicochimia, Geochimia, Climatologia, Statistica, Informatica și modelarea matematică. Un spectru atît de larg de interferențe solicită cu necesitate nu numai un efort deosebit din partea specialiștilor pentru a dobîndi un orizont larg și pentru a folosi cu rigoare informațiile ce țin de domeniile amintite, ci și o anumită mobilitate și deschidere, probabil mai greu de realizat. De aceea, după cum constată Atlas și Bartha: „cei mai mulți cercetători consideră că nu au avut și nici nu au nevoie de această pregătire generală, devenind specialiști în Ecologia microorganismelor prin extinderea pregătirii de bază, printr-o subspecializare care le restrînge aria de interes la niște limite adecvate studiului unui anumit mediu sau unor anumite grupuri de microorganisme".

— Unele abordări condiționate de tehnici și aparatură adecvată au restrîns, de asemenea, accesibilitatea la explorarea unor medii naturale.

Ele decurg din capacitatea microorganismelor de a coloniza sau de a supraviețui în habitatele cel mai puțin adecvate vieții ca fundul și sedimentele oceanice, ghețurile polare, rocile și zăcămintele de țiței, deșeurile și izvoarele hidrotermale submarine și de a metaboliza cele mai neobișnuite surse anorganice ($N_2$, S, CO, $CO_2$) sau organice (hidrocarburi, fenoli, crezoli, lemn, asfalt etc.). Este importantă de menționat răspîndirea lor neobișnuită pe verticală la înălțimea de 12 000 m în atmosferă, la 4 000 m în pămînt și respectiv la 11 100 m în adîncul oceanelor.

Condițiile care au favorizat apariția Ecologiei microorganismelor sînt, de asemenea, numeroase și importante.

Între altele, a devenit evident că studiile efectuate în principal în ultimele decenii nu puteau rămîne o simplă colecție de date obținute în laborator, în condiții pe care microorganismele nu le întîlnesc niciodată în natură.

A devenit, de asemenea, evident că multe procese determinate de microorganisme depășesc prin consecințele lor granițele mediilor în care sînt evidențiate și pot afecta, uneori, nu numai o anumită porțiune limitată din mediul natural, ci chiar ecosistemul global.

— Explorarea unor medii extreme încă neinvestigate sistematic (hipertermale, hipersaline, hiperbarice) a evidențiat existența unor forme de viață și a unor procese microbiene cu totul neobișnuite. Existența lor a stimulat curiozitatea cercetătorilor pentru anumite sisteme biologice și procese, care, pe lîngă interesul științific direct, au un impact pozitiv asupra unor probleme fundamentale ale biologiei (originea vieții, apariția și evoluția organismelor procariote și eucariote, condițiile extreme de existență a vieții etc.) sau ale practicii (formarea și exploatarea zăcămintelor de petrol și cărbuni, exploatarea resurselor de biomasă a unor medii neobișnuite etc.).

— În mod evident, perfecționarea tehnicilor de studiu (de la cele convenționale de cuantificare a activității microorganismelor la cele de biologie moleculară sau fizico-chimice sofisticate au avut un rol important prin mărirea gradului de rigurozitate a determinărilor. S-au adăugat instrumentarul de înaltă performanță — uneori cu caracter strategic — adecvat explorărilor spațiale sau vehiculele-sondă, manevrate de la suprafață pentru studiul adîncului oceanelor.

— În sfîrșit, un factor dinamizator cert al evoluției Ecologiei microorganismelor este reprezentat de implicarea societății umane și de nevoia ei de a rezolva unele probleme majore ca: monitorizarea activității microorganismelor în mediile naturale, relația cu productivitatea unor ecosisteme cu importanță majoră, poluarea și depoluarea solului și a mediilor acvatice, nevoia de a degrada unele substanțe complexe de sinteză, unele cu efecte mutagene, teratogene, oncogene, controlul dăunătorilor agricoli, combaterea proceselor de biodegradare și biodeteriorare a unor bunuri cu valoare culturală și/sau economică, prelucrarea și valorificarea reziduurilor solide sau lichide etc.

Sub impulsul acestor factori s-a impus cu necesitate stabilirea unor principii generale care guvernează interacțiunile dintre microorganisme și mediul lor natural și implicit racordarea acestor preocupări la conceptele fundamentale ale Ecologiei generale. A rezultat un nou domeniu de cercetare, Ecologia microorganismelor o știință „condamnată să reușească" (Ralbaud și Ducluzeau, 1984).

După T. D. Brock, M. Alexander și C. ZoBell, caracterul dinamic al domeniului nou creat este asigurat de un mare număr de personalități științifice, care au adus, într-o perioadă scurtă de timp, contribuții majore la structurarea bazelor sale teoretice și practice. Într-o enumerare evident lacunară, între aceștia citām pe: R. M. Atlas, R. Bartha, R. Campbell, E. A. Dawes, R. Doyle, M. Fletcher, H. L. Ehrlich, R. E. Hungate, H. W. Jannasch, D. M. Karl, E. R. Leadbetter, M. Lynch, R. Y. Morita, J. S. Poindexter, J. R. Postgate, G. Rheinheimer, A. D. Rovira, J. H. Slater, H. Smith, H. Stolp, M. Shilo, R. Y. Stanier, F. B. van Es, H. Veldkamp, R. Whittenbury, J. W. T. Wimpenny, J. G. Zeikus.

La elaborarea lucrării de față am beneficiat nu numai de realizările științifice ale autorilor menționați, ci și de sprijinul direct prin furnizarea unui număr mare din lucrările publicate în ultimele decenii, fapt pentru care ne exprimăm întreaga noastră gratitudine.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA ÎNTÎI

# BAZELE TEORETICE ALE ECOLOGIEI MICROORGANISMELOR

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# ECOSISTEMELE MICROBIENE*
# ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN ECOSISTEM

**„Ca domeniu de studiu, Ecologia microorganismelor nu trebuie separată de Ecologia „generală". În timp ce răspunsul la unele întrebări specifice necesită tehnici analitice specializate, interacțiunile dintre microorganisme nu pot fi înțelese fără cunoașterea bazelor ecologiei".**

W. J. WIEBE

**„Înțelegerea „Ecologiei microorganismelor ne permite să ajungem la soluții acceptabile pentru problemele cruciale din agricultură, recuperarea resurselor, sănătate publică și controlul poluării, printr-o abordare științifică, gîndită planificat, în locul uneia întîmplătoare".**

R. M. ATLAS
R. BARTHA

**„Țelul final al „Ecologiei microorganismelor" este de a mări cunoașterea științifică pentru o mai bună înțelegere a vieții microorganismelor în natură".**

H. STOLP

Ecologia microorganismelor este un domeniu care prezintă numeroase aspecte contradictorii atît din punct de vedere teoretic, cît și sub raportul confruntării rezultatelor obținute în laborator cu datele și interacțiunile din natură.

---

* Termenul „Ecosisteme microbiene" este folosit curent în lucrările de Ecologia microorganismelor, motiv pentru care l-am menținut în această lucrare, deși ecosistemele pur microbiene sînt extrem de rare. El contravine conceptului de ecosistem din Ecologia generală, în a cărui structură, componentul biotic include, pe lîngă microorganisme, plante și animale. Cazul reflectă încă una dintre numeroasele dificultăți de conciliere între conceptele și nomenclatura Ecologiei generale și cele ale Ecologiei microorganismelor, frecvent întîlnite pe parcursul acestei lucrări.

BCU CENTRAL UNIVERSITARA LIBRARY

Demersul de racordare la conceptele fundamentale ale Ecologiei generale nu este lipsit de dificultăți.

Cunoștințele referitoare la multe aspecte ale biologiei microorganismelor în mediile naturale sînt încă lacunare. Încercarea de a extrapola datele realizate cel mai adesea *in vitro* la condițiile din natură și mai ales de a le încadra în concepte formulate pentru plante și animale este foarte dificilă.

Există, de asemenea, nu puține dificultăți legate de terminologia de specialitate, nu întotdeauna adecvată. Aceasta explică afirmația lui Karl (1980) după care „nici o abordare a Ecologiei microorganismelor nu este universal acceptată".

Cele mai multe cunoștințe referitoare la activitatea microorganismelor în natură au fost deduse din studierea lor în condiții de laborator, în special în sisteme de cultură lichide, considerate ca ideale pentru determinarea relației dintre fiziologia microorganismelor și compoziția mediului natural. Aceste tehnici de studiu au fost folosite și perfecționate continuu de-a lungul evoluției Microbiologiei ca știință, cu rezultate foarte bune, deoarece majoritatea cunoștințelor de biochimie, fiziologie, genetică etc. au fost obținute pe această cale.

Cercetările au fost efectuate inițial în spații „închise" sub forma culturilor discontinue („Batch-culture").

Utilizarea sistemelor deschise, de tipul chemostatelor (Monod, 1950; Novick și Szilard, 1950), a deschis calea studiului populațiilor de microorganisme spațial și temporal omogene în condiții variabile de mediu. Oarecum indirect, aceste cercetări au transformat concepțiile privind creșterea microorganismelor în mediile naturale, dar fără rezultate notabile imediate. Această situație este determinată de faptul că, prin definiție, culturile în medii lichide și în special cele din sistemele omogenizate agitate mecanic sînt omogene în termeni spațiali, în sensul că analiza probelor recoltate din orice regiune a recipientelor de cultură dă rezultate identice. Omogenitatea facilitează posibilitățile de control al activității microorganismelor și a devenit, în felul acesta, un obiectiv major în biotehnologie, pentru care au fost imaginate numeroase tehnici și echipamente specifice.

Ideea superiorității studiilor bazate pe sisteme omogene explică opțiunea specialiștilor în domeniul Ecologiei microorganismelor, care au ales de la început această cale de studiu. S-a recurs, în special, la tehnicile de cultură continuă, introducînd, ca un element de noutate specific, studiul comportării *consorțiilor* de microorganisme, respectiv a unor grupuri de organisme diferite care pot coexista și interacționa cînd cresc împreună într-un sistem în flux continuu și în condiții variabile, controlate de mediu.

Rezultatele deosebit de interesante obținute au determinat o supraestimare a valorii lor, în special din partea microbiologilor, mai puțin acomodați cu condițiile proprii mediilor naturale. A existat și există încă chiar tentația de a considera că studiul interacțiunilor complexe dintre populațiile de microorganisme existente în mediile naturale nu este necesar, deoarece natura și amploarea acestora pot fi deduse din proprietățile unităților componente și din comportarea lor *in vitro*.

În ultimul deceniu au fost efectuate studii în mediile naturale cu metode progresiv perfecționate, care au demonstrat caracterul eronat al acestui punct de vedere. Fără a infirma rezultatele obținute *in vitro*, studiile de teren au arătat că regulile deduse pe baza lor încetează de a fi relevante

pentru comportamentul comunităților naturale de microorganisme în habitatele lor. Regulile stabilite la nivele mai simple nu sînt aplicabile la nivele superioare de complexitate. Pentru a înțelege comportamentul întregului care interacționează (microorganisme, alte organisme și mediul abiotic) trebuie formulate reguli diferite (Wimpenny, 1981). Mai plastic exprimat, construcția unui edificiu depinde de proprietățile blocurilor de construcție, dar concepția și arhitectura care stau la baza lui au o relevanță incontestabil superioară.

Termenul de *ecosistem* a fost formulat inițial de Tansley (1935) pentru a caracteriza comunitățile de plante și animale, ca și mediul lor natural. După cum este evident, definiția nu include microorganismele și nu limitează mărimea în spațiu a ecosistemelor. Un cadru conceptual mai adecvat este cel de unitate funcțională de bază a naturii care cuprinde atît organismele, cît și mediul înconjurător neanimat, intim legate printr-o varietate de procese fizice, chimice și biologice. Ecosistemul include, deci, un *component biotic* (populația sau comunitățile de organisme) și unul *abiotic* (mediul fizic, nutrienții disponibili, substanțele minerale, primare sau secundare, substanțele organice, gaze atmosferice etc.), legate prin relații trofice, flux de nutrienți și energie. Ambii componenți sînt esențiali pentru menținerea și dezvoltarea sistemului (Borman și Liskens, 1976).

Elemente asemănătoare, de precizare a cadrului conceptual, se regăsesc și în alte definiții moderne. Astfel, Botnariuc și Vădineanu (1982) definesc ecosistemul ca unitatea elementară de organizare a biosferei alcătuită din biotopul* ocupat de o biocenoză și capabilă de realizarea productivității biologice.

Lincoln, Boxshall și Clark (1982) definesc ecosistemul ca fiind reprezentat de comunitatea de organisme și mediul fizic cu care interacționează ca o unitate ecologică sau, respectiv, de conținutul integral biologic și fizic al unui biotop.

Atlas și Bartha (1987) scot în evidență dificultățile și ambiguitatea inerentă ce decurg din aplicarea unor concepte și termeni formulați pe baza studiului plantelor și animalelor în Ecologia microorganismelor. Ei relevă caracterul echivoc al unui termen ca acela de „ecosistem microbian de pădure", în care microorganismele prezente pe frunzele unui arbore nu prezintă virtual nici o interacțiune cu microorganismele arborilor adiacenți. De asemenea, ei se întreabă dacă microbiota de pe o singură frunză a unui arbore poate fi considerată o „comunitate microbiană" cînd componentul „productiv" autotrof aparține plantei și în populațiile de microorganisme nu există nici un organism autotrof.

Aceste dificultăți sînt sesizate și de Margulis, Chase și Guerrero (1986), iar îndepărtarea lor este considerată posibilă cînd cunoștințele de Ecologia microorganismelor vor permite formularea unor criterii, concepte și termeni adecvați, meniți să-i înlocuiască pe cei utilizați arbitrar.

Înțelegerea proceselor desfășurate de microorganisme în natură implică cu necesitate efectuarea atît a studiilor autecologice, cît și a celor sinecologice.

*Demersul autecologic* vizează Ecologia organismelor aparținînd unei singure specii, respectiv efectul acesteia asupra mediului înconjurător, bazele

---

* *Biotopul* reprezintă cea mai mică unitate geografică a biosferei sau a unui habitat, care poate fi delimitată de granițe adecvate și care este caracterizat prin biota sa proprie (Lincoln, Boxshall și Clark, 1982).

adaptării la particularitățile și condițiile de stres ale habitatului respectiv, precum și impactul mediului asupra lor. Cele mai avansate studii autecologice sînt cele referitoare la agenții patogeni pentru om, animale și plante.

*Abordarea sinecologică* urmărește studiul populațiilor, comunităților sau sistemelor, respectiv studiază diferitele specii, complexul de organisme și asocierea ansamblului speciilor cu componenții abiotici ai mediului importanți din punct de vedere biologic. Obiectivul principal al cercetării sinecologice a ecosistemelor microbiene este, între altele, înțelegerea schimbului de materie și energie în și între diferitele compartimente vii și nevii. Utilizînd ambele modalități de studiu, au fost bine definite structura și funcția unor comunități de microorganisme, cum sînt cele din rumen, au fost izolate și identificate cele mai multe microorganisme active, s-au stabilit *in vitro* potențialul și bazele relațiilor lor metabolice și s-a realizat înțelegerea funcției globale a ecosistemului.

## ARHITECTURA ECOSISTEMELOR MICROBIENE. HETEROGENITATEA ȘI ORGANIZAREA LOR SPAȚIALĂ ȘI TEMPORALĂ

**„A investiga arhitectura ecosistemelor microbiene înseamnă să intri într-o lume nouă, captivantă și uneori plină de farmec".**

J. W. T. Wimpenny
R. W. Lovitt
J. P. Coombs

Ecosistemele microbiene naturale au o structură complexă și sînt aproape totdeauna heterogene sub raportul populațiilor de microorganisme indigene și organizate spațial și temporal. Wimpenny (1981) descrie două deosebiri majore între ecosistemele microbiene și culturile omogene de laborator:

1) cele mai multe habitate naturale sînt colonizate de mai multe tipuri de populații, deci corespund culturilor mixte;

2) spre deosebire de mediile omogene, ecosistemele microbiene naturale au o proprietate distinctivă majoră, reprezentată de organizarea spațială a microorganismelor componente. Consecința imediată este că ele se dezvoltă în gradiente de molecule solubile, biologic active.

Diferențierea spațială este evidențiată de procesele de stratificare și zonare, iar cea temporală de succesiunile diferitelor populații de microorganisme în ecosistem. Observate perioade îndelungate de timp, anumite habitate pot fi în stare de echilibru, deoarece, apreciate ca întreg, compoziția lor nu se schimbă semnificativ pe măsură ce creșterea compensează moartea unor microorganisme, ca și reciclarea nutrienților, degradarea și utilizarea lor. Pe scară microscopică însă, întregul ecosistem poate suferi numeroase modificări succesionale (Wimpenny, Lovitt și Coombs, 1983). Existența unei organizări spațiale (heterogenitatea) implică cu necesitate ideea unui transfer vectorial al substanțelor solubile, caracterizat nu numai prin magnitudine,

ci și prin direcția fluxului de la o regiune care acționează ca sursă spre alta în care concentrația lor scade în mod evident.

Caracterul structurat heterogen impune cu necesitate studiul ecosistemelor microbiene cu ajutorul unor metode specifice bazate pe modele heterogene. În acest sens, Wimpenny (1981) recomandă o serie de dispozitive și tehnici a căror utilizare va permite, probabil, descifrarea legităților proprii acestor sisteme. Cele mai importante sînt următoarele:

1) *Gradostatele*, sisteme de dispozitive de cultivare interconectate, care permit stabilirea echilibrată a unor gradiente bidirecționale de substanțe solubile.

2) *Coloanele de percolare*, aplicabile la studiul solului, capabile să realizeze o stratificare verticală a microorganismelor și a metaboliților lor, ca și a unor gradiente de concentrație a nutrienților și a produșilor de excreție.

3) *Metodele capilare.*

4) *Metodele de difuzie în gel.*

5) *Studiul biofilmelor din reactoare.*

6) *Studiul coloniilor bacteriene*, ca arhetip de sistem heterogen structurat natural.

## ECOSISTEMELE MICROBIENE ORGANIZATE SPAȚIAL

Wimpenny (1981), precum și Wimpenny, Lovitt și Coombs (1983) atrag atenția asupra semnificației ecologice de excepție a arhitecturii ecosistemelor microbiene (tabelul nr. 1).

Aceste ecosisteme în care organismele sînt localizate la poziții fixe în spațiu sînt întîlnite într-o gamă largă de medii naturale și variază, ca dimensiuni, de la cîțiva μm, în unele biofilme (pelicule) de microorganisme, pînă la zeci sau sute de metri, în lacurile meromictice stratificate.

Microorganismele prezente în număr mare într-un teritoriu fix spațial generează și răspund la gradienți de difuzie a substanțelor solide.

Existența lor este foarte evidentă în cele mai multe medii naturale.

Solurile prezintă o enormă heterogenitate de structură fizică și chimică sub raportul conținutului în aer și apă, al substanțelor minerale, al naturii și cantității de materie organică etc.

Gradiente de difuzie a diferitelor gaze ($O_2$, $N_2$, $CO_2$ etc.) au fost descrise atît în funcție de adîncimea solului, cît și în particulele individuale de sol (fig. 1). Acestea pot avea regiuni centrale lipsite de nutrienți importanți sau de $O_2$. Deși $O_2$ difuzează prin porii solului de aproximativ zece mii de ori mai repede decît în apă, producerea de gradiente este influențată de gradul diferit de umiditate, precum și de structura și gradul de apropiere al particulelor de sol („Tortuosity factor"), care pot reprezenta obstacole fizice în calea difuziei $O_2$.

Fenomene similare sînt evidente în lacurile stabil stratificate vertical sub raportul gradientului de $O_2$ și $H_2S$, al compușilor cu C, N și S, care determină un larg spectru de activități biochimice. Gradientele de difuzie a substanțelor solubile sînt prezente chiar în cazul „ecosistemelor sferice" descrise de Wimpenny (1981). Ele sînt reprezentate de conglomerate de microorganisme asociate cu cantități variabile de materie organică și anorganică, care apar ca: 1) „gheme" de miceliu fungic, formate în culturile agitate, cu consecințe asupra reologiei sistemului; 2) flocoane de nămol

*Tabelul nr. 1*

**Exemple de ecosisteme microbiene spațial heterogene**
(după Wimpenny, Lovitt și Coombs, 1983)

| Clasa ecosistemului | Exemple | Scala de mărime | Caracteristici |
|---|---|---|---|
| Organizate vertical (stratificat) | Biofilme microbiene | μm — mm | Aproape orice suprafață expusă unei soluții adecvate de nutrienți poate fi colonizată de microorganisme. Exemple: „fulingul" marin, filtrele stațiilor de epurare, bioreactoare, neustonul, instalații de producere a acidului acetic prin „metoda rapidă" (germană), colonizarea fitoplanului, caria dentară etc. |
| | Coloniile microorganismelor | μm — mm | Prezintă heterogenitate spațială și, de asemenea, potențial morfogenetic limitat. |
| | Sisteme sedimentare | mm — cm | Prezente la baza tuturor tipurilor de ape: mări și oceane, riuri, bălți, soluri inundate sau irigate etc. Conțin substanțe organice și minerale, și sînt omogen saturate cu apă. |
| | Sol | cm — m | Amestec complex de substanțe organice și anorganice, neregulat stratificate. Materia vie și neanimată conține proporții variabile de faze gazoase și lichide. |
| | Apă | cm — m | Bazine acvatice stratificate inclusiv termale, lacuri cu apă dulce, lacuri și mări meromictice, permanent stratificate (ca, de exemplu, Marea Neagră ș.a.). |
| Organizat radiar sau cilindric | Grăunțe de sol | mm | Structuri neregulate, care conțin substanțe organice și anorganice, ca și organisme vii menținute, adesea, împreună de polimeri produși pe cale biologică. Pot prezenta între ele modificări bruște de gradient de $O_2$ și nutrienți. |
| | „Flocoane" de microorganisme | mm | Aglomerări neregulate de microorganisme vii prezente în nămolurile active din stațiile de epurare. |
| | „Gheme" miceliene | mm | Alcătuite din micelii strîns întrețesute în cursul fermentațiilor industriale. Pot prezenta gradiente bruște în concentrația substanțelor solubile. |
| | Rizosferă | μm—mm | Biofilm microbian organizat lax, înconjurînd rădăcinile plantelor. Poate reduce concentrația $O_2$ în apropiere. |
| Organizat orizontal (zonare) | Gradient termic | cm—m | Izvoare sulfuroase termale. Prezintă modificări caracteristice ale populațiilor, în avalul unui gradient termic. |
| | Gradient organic | m | Regiune situată la nivelul sau în aval de deversarea apelor reziduale într-un riu. |
| | Gradient de salinitate | cm — m | Gradientele de salinitate la marginea lacurilor sărate sau la litoralul marin induc modificări în structura populațiilor de microorganisme. |

activat, în stațiile de tratare a apelor uzate; 3) aglutinate de levuri din industria berii etc. Însăși structura lor creează diferențe majore între celulele localizate la periferia sistemului și cele din centrul său, cu gradiente de difuzie între aceste extreme.

Datorită gradientelor de concentrație a diferitelor substanțe solide și a unor gaze, microorganismele vor produce răspunsuri fenotipice diferite în funcție de localizarea lor. Genotipurile diferite prezente în structura spațială respectivă vor răspunde, fiecare, mai bine sau mai rău, în funcție de coordonatele particulare zonei în care se găsesc.

Wimpenny (1981) consideră că un factor esențial pentru înțelegerea particularităților de heterogenitate a ecosistemului este cunoașterea compoziției fizico-chimice a soluțiilor apoase din mediu și a modului în care ele se schimbă în timp și în spațiu. Două motivații justifică acest punct de vedere:

1) în ecosistemele naturale, compoziția fizico-chimică a lichidelor determină natura și numărul microorganismelor care pot crește în prezența lor;

2) cunoașterea fluxului substanțelor solubile este importantă, deoarece atît înglobarea diferitelor substrate, cît și eliminarea produșilor rezultați din metabolism sînt condiționate de deplasarea moleculelor dizolvate într-un spațiu mic, adiacent membranei externe a celulelor.

Difuzia moleculară este mecanismul de transfer dominant al substanțelor solubile și, probabil, principalul factor limitant al dezvoltării microorganismelor într-un anumit habitat.

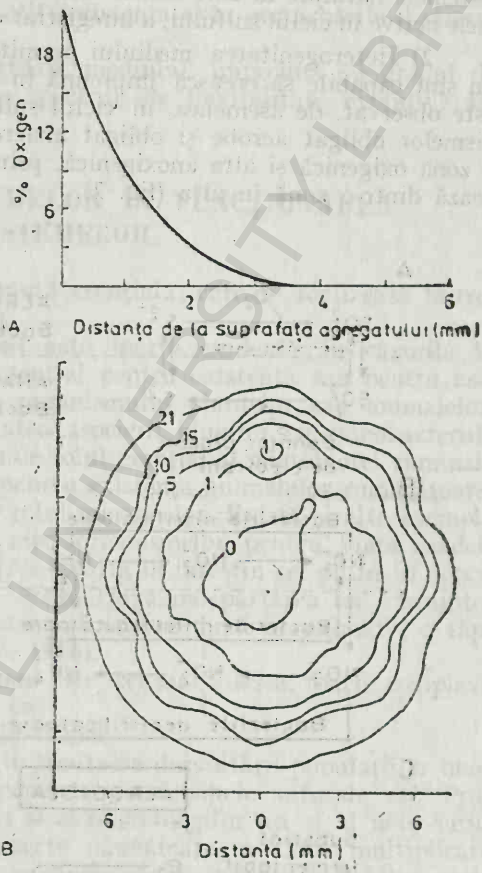



Fig. 1. — Concentrația oxigenului în jurul agregatelor de sol. A. Profilul concentrației $O_2$ într-un agregat de sol (lut prăfos) cultivat, evidențiind scăderea rapidă sub suprafață și formarea unei zone anaerobe. B. Harta concentrațiilor oxigenului într-un agregat de sol cultivat, evidențiind zona anaerobă centrală. Cifrele indică procentul $O_2$ în conturul respectiv (după Sexstone, 1985).

## IMPORTANȚA HETEROGENITĂȚII SPAȚIALE ȘI TEMPORALE A ECOSISTEMELOR MICROBIENE NATURALE

Sintetizînd o serie de date din literatură, Wimpenny, Lovitt și Coombs (1983) consideră că heterogenitatea structurală și temporală reprezintă proprietăți cu importanță deosebită pentru că:

1) Transferul substanțelor solubile prin difuzie joacă un rol dominant în determinarea vitezelor de metabolism în anumite ecosisteme. Ei citează datele lui Jorgensen (1981), care, comparînd vitezele de metabolism în ecosistemele naturale în care zonele anoxice și oxigenice cuplează microorganismele active în ciclul sulfului, a înregistrat diferențe de șase ordine de mărime.

2) Heterogenitatea mediului permite interacțiuni între organisme care nu sînt capabile să crească împreună în același habitat omogen. Fenomenul este observat, de asemenea, în ciclul sulfului, cînd metabolismul microorganismelor obligat aerobe și obligat anaerobe este cuplat la interfața dintre o zonă oxigenică și alta anoxigenică, prin intermediul compușilor care difuzează dintr-o zonă în alta (fig. 2).

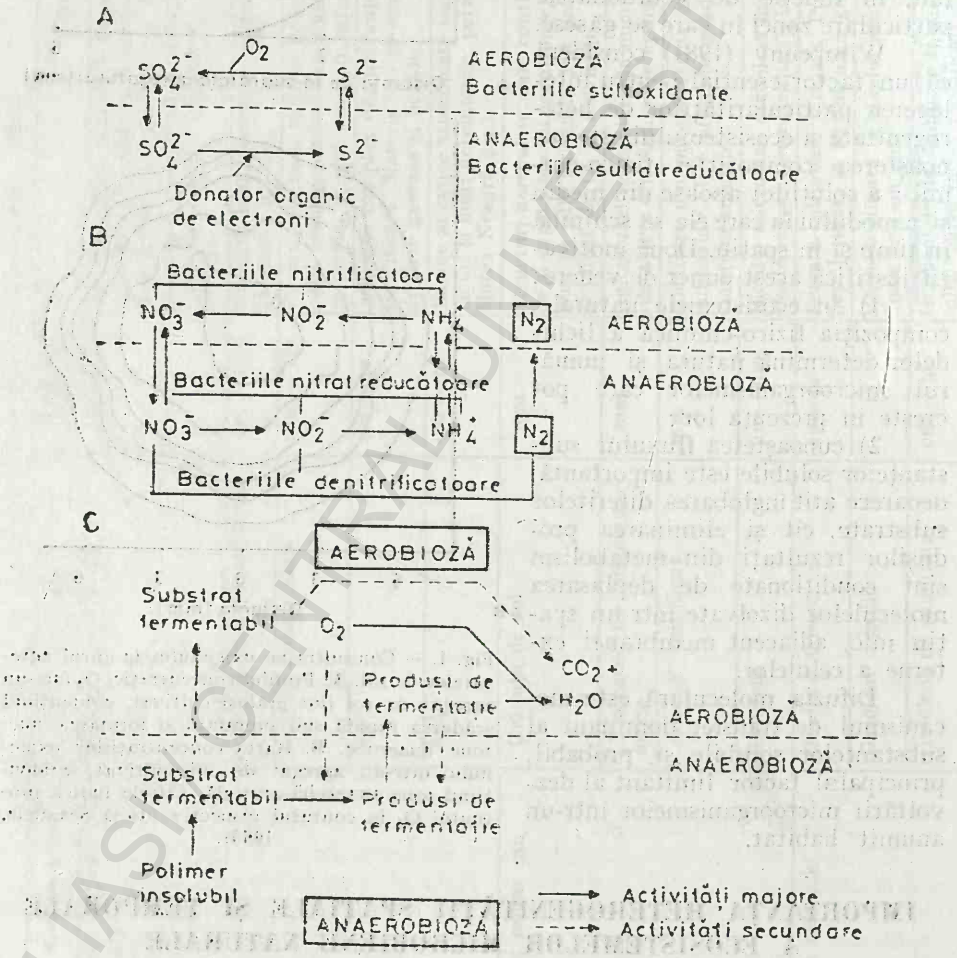



Fig. 2. — Interacțiunile dintre habitate. A. Interacțiuni în circulația sulfului. B. Interacțiuni în circulația azotului. C. Discontinuitățile habitatului leagă metabolismul microorganismelor aerobe de cel al microorganismelor anaerobe, în procese de fermentare a unui polimer insolubil (după Wimpenny, 1984).

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

3) Heterogenitatea stimulează diversitatea tipurilor de microorganisme prezente într-un habitat, prin faptul că oferă un spectru larg de nișe pentru dezvoltarea diferitelor specii de microorganisme.

4) Heterogenitatea stimulează stabilitatea ecosistemului, deoarece cu cît populațiile sînt mai diferite, cu atît rezistența ei la perturbările și stresul din mediu este mai mare.

5) Frecvența și gradul perturbării mediului, împreună cu gradul de heterogenitate, determină viteza și spectrul de flexibilitate evolutivă ale unui anumit ecosistem.

## ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FUNCȚIONAREA ECOSISTEMELOR

Microorganismele au o importanță esențială, care se realizează la trei nivele diferite (Hawksworth, 1992):

1) **Acțiunea la nivel individual** este foarte evidentă în cazurile în care rolul microorganismelor este esențial pentru existența sau pentru asigurarea unei dezvoltări normale a organismului plantelor sau animalelor. Primul caz este ilustrat de necesitatea asocierii fungilor cu cianobacteriile sau cu algele în geneza lichenilor sau de rolul esențial al microbiotei ruminale (bacterii, microfungi și protozoare) pentru existența animalelor rumegătoare. Cel de-al doilea este exemplificat de rolul micorizelor. Există și alte exemple ce demonstrează rolul esențial al microorganismelor pentru viața gazdei. Specia de termite *Trichonympha amfla* poartă în intestin cel puțin 10 specii de bacterii, încă necultivabile *in vitro*. După îndepărtarea lor, cu ajutorul substanțelor antibiotice, gazda axenică moare după aproximativ o săptămînă (Margulis, Chase și Guerrero, 1986).

2) **Acțiunea la nivel de ecosistem** este, cel mai adesea, foarte complexă și ilustrată de numeroase exemple ca:

a) Rolul în lanțurile și rețelele trofice.

b) Rolul unor agenți patogeni în limitarea dezvoltării populațiilor unor anumite organisme, care ar putea perturba ecosistemele naturale etc. Procesul este ilustrat de rolul bacteriilor și al microfungilor (ca și al unor viruși) în reglarea populațiilor de insecte dăunătoare, a căror multiplicare necontrolată, anarhică, ar putea avea efecte nocive asupra culturilor agricole, pădurilor etc.

c) Rolul în formarea și menținerea structurii solului, esențial pentru circulația apei, a aerului și a nutrienților.

d) Microorganismele pot fi bioindicatori pentru „sănătatea" ecosistemelor, prin capacitatea de a semnala timpuriu apariția unor modificări negative ale acestora, decurgînd din activitatea unor poluanți sau alți factori perturbatori, înainte ca acestea să afecteze organismele mai evoluate. În acest sens este evidentă importanța fungilor din structura lichenilor, care reacționează la prezența poluanților gazoși sau a fungilor de micorize sensibili la ploile acide.

De menționat că, în afară de existența unor microorganisme cu activități complementare, care efectuează diferite funcții pe bază de interacțiuni mai mult sau mai puțin complexe, în natură există și o redundanță funcțională, în sensul prezenței în cele mai multe ecosisteme a mai multor microorganisme cu activități similare. Lipsa de specificitate a fungilor de ecto-

micorize permite realizarea eficientă a asocierii arborilor, cu oricare din speciile prezente în sol, în așa fel încît dispariția uneia sau a unora dintre acestea nu are efecte semnificative asupra arborilor sau ecosistemului. Redundanța funcțională a microorganismelor într-un ecosistem are un rol pozitiv, în sensul că îl face mai puțin vulnerabil la modificările inerente ale condițiilor naturale (Hawksworth, 1992).

Sintetizînd datele referitoare la degradarea substanțelor organice în mediile acvatice, Pomeroy (1980) consideră că rolul microorganismelor, în general, și al bacteriilor, în special, în fluxul de materie și energie este subestimat atît de microbiologi, cît și de specialiști în ecologie acvatică. Această optică eronată este consecința ineficienței tehnicilor de măsurare a activităților metabolice și de multiplicare a bacteriilor în natură, care fac ca rolul lor și relațiile cu restul rețelei trofice să nu fie înțelese corect. În plus, unii cercetători consideră, de asemenea în mod eronat, că bacteriile ar reprezenta, pe de o parte, un punct terminus energetic, deoarece ar fi asimilatori ineficienți, iar, pe de alta, pentru că nu sînt utilizate ușor de organismele mai evoluate. Or, după cum s-a demonstrat, datorită dimensiunilor lor mici, raportului mare suprafață/volum și mecanismelor de transport cu mare afinitate și eficiență bacteriile pot îngloba o gamă largă de nutrienți, aflați chiar în cantități micro- sau nanomoleculare. În plus, marea capacitate de asimilare este asociată cu enorma lor versatilitate metabolică, cu marea capacitate de adaptare și de restructurare genetică, mediată de plasmide, care le permit să asimileze chiar cele mai neobișnuite substanțe din mediu.

Hobbie și Crawford (1969) apreciază că în mediile acvatice, la concentrațiile naturale de nutrienți, asimilarea unor substrate de către comunitățile naturale de bacterii este mai mare de 50%. Ca urmare, o rețea trofică incluzînd bacteriile este la fel de eficientă sau chiar mai eficientă decît una lipsită de bacterii.

Bacteriile participă și într-o formă relativ indirectă în circulația materiei în ecosistem. Saunders (1972) consideră că în acord cu natura mediilor acvatice, zooplanctonul ar putea consuma între 10 și 90% din fitoplancton, în funcție de forma, mărimea și digestibilitatea speciilor sale. Restul de 10% moare, fără să fie consumat și este degradat direct de bacterii. În plus, 30% din fracțiunea consumată de zooplancton și alți fitofagi este eliminată ca excrete și degradată de bacterii. Rolul bacteriilor este și în acest proces deosebit de pozitiv, în sensul că bacteriile multiplicate în cursul tranzitului intestinal al zooplanctonului măresc valoarea nutritivă a materialelor ingerate de acesta.

Datorită conținutului lor bogat în proteine și factori de creștere, biomasa bacteriană are o valoare nutritivă cu 1—2 ordine de mărime mai mare decît cea a detritusului originar, pe care s-au multiplicat (Campbell, 1977).

Concluzionînd, Pomeroy (1980, 1984) consideră că însumînd toate substratele potențiale din mediile acvatice este probabil că bacteriile degradează jumătate sau mai mult din producția primară a fitoplanctonului, indiferent de distribuția locală a substratelor specifice între diferitele surse și organisme.

În același timp, microorganismele fotosintetizante (cianobacteriile, algele și, în mai mică măsură, bacteriile fototrofe) au un rol esențial în conversia $CO_2$ în forme organice, asigurînd, în acest fel, productivitatea primară

a mediilor acvatice de apă dulce și marine, precum și, în anumite limite, îmbogățirea solului.

3) **La nivel global,** rolul microorganismelor este, de asemenea, esențial. Ca grup, ele întrunesc potențialități biochimice atît de mari, încît pot asigura circulația tuturor elementelor din compoziția substanțelor organice. Microorganismele au contribuit la formarea actualei atmosfere a Pămîntului, odată cu apariția fotosintezei oxigenice efectuată de cianobacterii și alge. Fixarea $N_2$ din atmosferă este efectuată în natură exclusiv de microorganismele procariote (eubacterii și cianobacterii). În absența $CO_2$ produs de microorganisme, rezerva de C din natură s-ar epuiza după aproximativ 40 de ani.

În sfîrșit, microorganismele au o importanță fundamentală în circulația celorlalte elemente biogene în natură și în asigurarea vieții pe Pămînt.

Capitolele următoare ilustrează și diversifică aceste funcții ale microorganismelor, cu importanță considerabilă. Ele sînt, în unele cazuri, esențiale sau cel puțin cu importanță deosebită pentru asigurarea existenței sistemelor biologice.

## COLONIA BACTERIANĂ CA ECOSISTEM

**„În cel mai strict sens, colonia bacteriană este un „ecosistem natural", deși apare în toată splendoarea ei în microcosmosul de laborator numit placa Petri".**

J. W. T. Wimpenny
R. W. Lovitt
J. P. Coombs

Colonia bacteriană reprezintă rezultatul creșterii și al multiplicării, la un loc, pe o zonă mică, de obicei circulară, a descendenților uneia sau mai multor celule aparținînd aceleiași specii. Formarea ei se datorește faptului că pe medii solide și semisolide mișcările browniene, ca și mobilitatea bacteriilor sînt, în bună parte, inhibate, ceea ce permite aglomerarea într-o arie limitată a celulelor derivate dintr-un șir de diviziuni succesive.

După Wimpenny, Lovitt și Coombs (1983), colonia bacteriană este un exemplu tipic de creștere a bacteriilor în condiții heterogene. Ea este mai mult decît o simplă colecție de celule: ca și corpul unui organism pluricelular, reprezintă o populație celulară al cărui aspect exterior, macroscopic, și organizare interioară sînt determinate de proprietățile specifice ale celulelor individuale și de relațiile reciproce dintre indivizii aflați în strînsă asociație.

Multe colonii au aspecte atît de caracteristice încît pot fi recunoscute ușor după forma, mărimea, culoarea, aspectul suprafeței, consistență etc. Aceasta înseamnă că populația care se dezvoltă, teoretic, de la o bacterie unică se grupează, în mod caracteristic, conferind ansamblului o arhitectură complexă, decurgînd din: forma și mărimea organismelor individuale, tipul de multiplicare și de grupare, sinteza de pigmenți sau de macromolecule

extracelulare, mobilitate, ca și de factori extrinseci (frecarea de suprafața mediului, întîlnirea cu obstacole mecanice, tensiunea superficială, difuzia nutrienților etc.).

## Creșterea coloniilor bacteriene

Inițial, creșterea se realizează exponențial în raport cu timpul, ca rezultat al diviziunii bacteriei (sau bacteriilor) depuse pe suprafața mediului. După scurt timp, procesul de creștere devine mai lent și mai puțin regulat, ca urmare a interacțiunilor complexe dintre membrii coloniei și mediu.

Pe măsură ce colonia crește, între celulele ei se produce o adevărată competiție pentru substanțele nutritive. În plus, intră în acțiune diverse influențe negative legate de acumularea locală a unor produși toxici de uzură. Ca urmare, condițiile de viață ale celulelor sînt variabile în funcție de așezarea lor în colonie. Celulele de la periferia coloniei vin în contact cu cantități mai mari de $O_2$ și nutrienți, la nivelul lor, multiplicarea exponențială putînd continua o perioadă de timp; straturile mai profunde (sub 30—40 μm de la suprafață) se găsesc în anaerobioză și primesc numai substanțele nutritive care au putut difuza pînă la ele prin întreaga masă celulară.

În ceea ce privește accesibilitatea celulelor centrale și periferice față de acțiunea produșilor toxici de metabolism, care trebuie să difuzeze din celule și din colonie la exterior, situația este exact invers. Între aceste extreme „teritoriale" se stabilește un adevărat gradient de concentrații de $O_2$, nutrienți și substanțe de uzură, datorită cărora condițiile de viață ale membrilor coloniei acoperă o gamă largă de variante. Ca urmare, ordinea în care celulele se divid este mult complicată de condițiile complexe ale mediului, capabile să le influențeze potențialul de multiplicare. Beneficiind de aerobioză, celulele de la periferia coloniei se multiplică activ, pe cînd cele din mijlocul ei pot fi chiar moarte. Pirt și Magrou (1923) au confirmat acest punct de vedere cu ajutorul coloranților vitali care sînt încorporați numai de celulele situate la suprafață, cele din straturile profunde, anoxice, fiind pe cale de liză. În funcție de gradul de difuzie a nutrienților și a $O_2$, creșterea continuă și în unele regiuni limitate din interiorul coloniei, determinînd creșterea în înălțime a acesteia.

În general, coloniile cu formă regulată și diferențiere structurală minimă sînt formate din celule izolate sau grupate în perechi ori în lanțuri scurte, în timp ce acelea care au structuri mai variate și mai complicate sînt alcătuite din bacterii cu tendință de grupare în filamente.

La *Bacillus cereus* au fost evidențiate diferențe în mărimea și orientarea celulelor. Cele apropiate de periferia coloniei sînt lungi și aranjate paralel unele față de altele, în timp ce cele apropiate de centrul coloniei, considerabil mai mici, sînt dispuse aleatoriu. Probabil că diferențele de mărime sînt corelate cu diferențele de creștere. Fig. 3 prezintă distribuția oxigenului în și în jurul unei colonii de *B. cereus*, cultivată pe agar, triptonă și soia. De menționat că diferențele genetice minime induse de mutații între tulpinile aceleiași bacterii determină modificări importante în aspectul coloniilor. Astfel este cazul mutantelor „S" și „R" descrise la *Streptococcus pneumoniae* *.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 340.

După Brock (1974), focarele bacteriene produse în cursul infecțiilor sînt, probabil, analogi funcționali ai coloniilor dezvoltate pe mediile de cultură *in vitro*, iar interacțiunile cooperante ale organismelor individuale din structura lor determină evoluția procesului infecțios. El consideră că, în realitate,

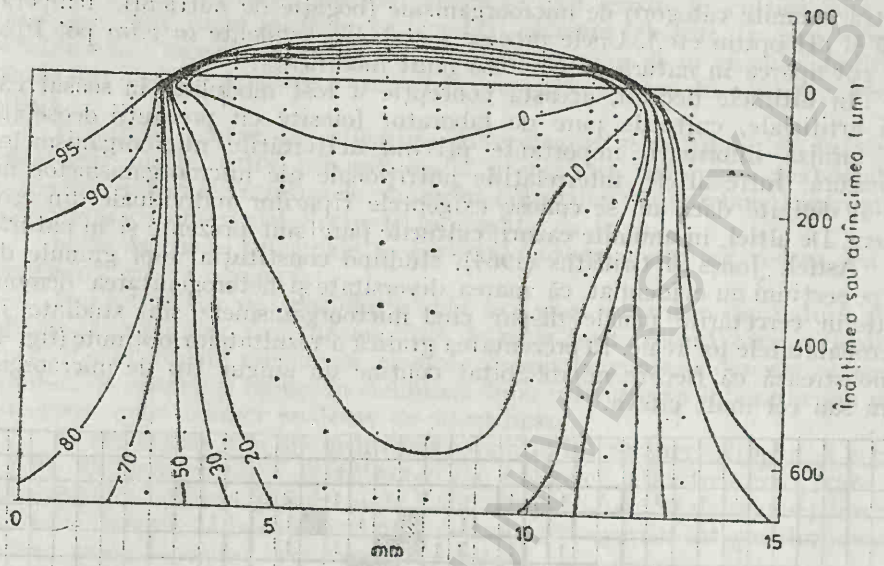



Fig. 3. — Distribuția oxigenului *în* și *în jurul* unei colonii de *Bacillus cereus*, cultivat pe agar—triptonă/soia, la 37°C (după Wimpenny și Coombs, 1981). Datele au fost obținute cu sensor de oxigen Transidyne (Transidyne General Corporation).

coloniile prezente în diferite medii naturale sînt mult mai importante decît se crede în general, dar că depistarea și studierea lor sînt foarte dificile, fapt care diminuează posibilitatea aprecierii rolului lor real.

## Semnificația ecologică a culturilor pure

**„Populațiile monotipice sînt în mod evident reducționiste, dar nu sînt prin aceasta irelevante pentru ecologia bacteriilor. Ba din contră".**

J. S. POINDEXTER
E. R. LEADBETTER

Obținerea culturilor pure a reprezentat un factor important în evoluția microbiologiei, deoarece a permis izolarea, identificarea și studiul proprietăților diferitelor microorganisme, contribuind la descoperirea unor procese fundamentale și legi ale acestei științe.

Concepția dominantă bazată pe studiul microorganismelor din sol era că, în general, culturile pure sînt rezultatul unui demers artificial, rezultat

al intervenției deliberate a cercetătorului, irelevant pentru activitatea acestora în natură. Într-adevăr, cultura pură este artificială în cele mai multe cazuri pentru că în natură, microorganismele interacționează cu alte microorganisme și cu habitatul lor, pe care le influențează și de care este influențat. În medii naturale nu sînt realizate condițiile aparent ideale, cel puțin pentru anumite categorii de microorganisme (bogăție de nutrienți, temperatură și pH optim etc.). Unele procese metabolice evidente *in vitro* pot lipsi sau pot apărea în natură cu o viteză mult modificată.

În ultimele decenii, această concepție a fost modulată în sensul că, deși artificiale, culturile pure de laborator folosite cu precauții deosebite pot furniza informații importante privind activitățile microorganismelor în natură. Între altele, interrelațiile nutriționale ale microorganismelor nu pot fi definite dacă nu se cunosc exigențele tipurilor individuale din ecosistem. De altfel, în anumite cazuri, culturile pure sînt prezente și în natură.

Astfel, Jones și Griffiths (1964), studiind constituția unor granule de sol pe secțiuni au evidențiat că marea diversitate și heterogenitatea demonstrate în cercetările uzuale dispar cînd microorganismele sînt studiate în microhabitatele lor reale. Reprezentarea grafică a rezultatelor obținute (fig. 4) demonstrează că fiecare microhabitat conține un singur tip de microorganism sau cel mult cîteva.

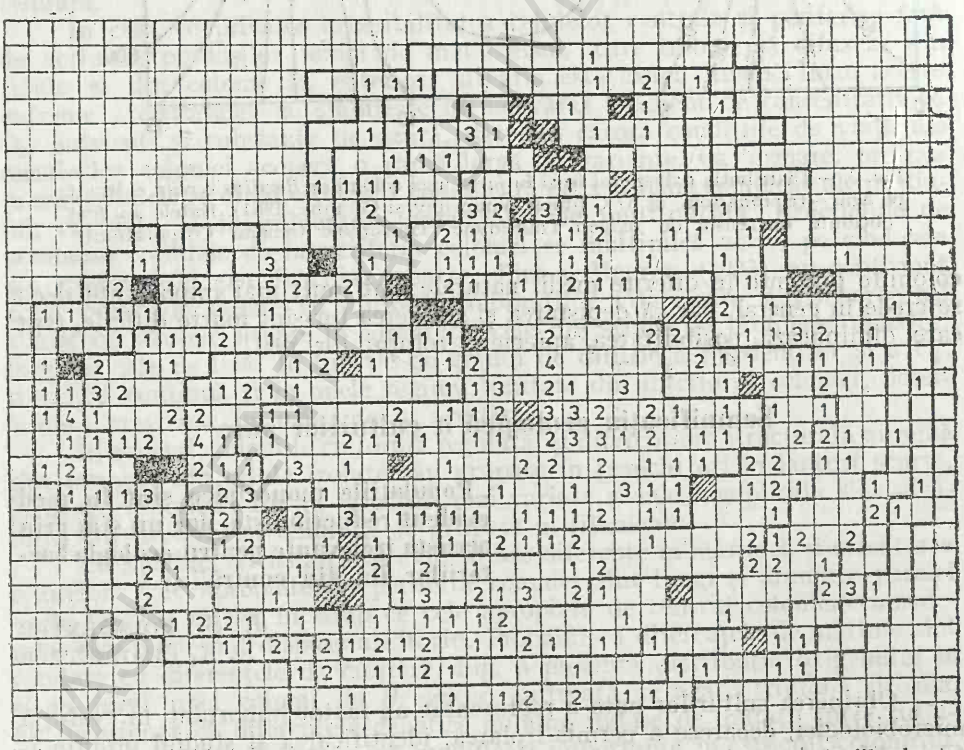


Fig. 4. — Harta unei secțiuni printr-un grăunte de sol, evidențiind distribuția coloniilor bacteriene. Cifrele indică numărul coloniilor bacteriene în fiecare pătrat de 70 μm². Zonele hașurate indică spațiile goale (fără sol ) sau cu detritusuri care au împiedicat numărătoarea. Reprezentarea demonstrează că bacteriile din sol trăiesc în microhabitate, care conțin fie o singură specie, fie mai multe specii diferite (după Jones și Griffiths, 1964).

Pe această bază, Brock (1974) consideră că, în anumite situații, cultura pură de laborator reprezintă reproducerea *in vitro* a unei situații potențial existentă în natură.

De asemenea, după cum s-a demonstrat fără echivoc, în anumite medii naturale foarte selective, microorganismele pot exista în culturi pure sau cvasipure. Este cazul mediilor cu condiții extreme (ghețari, izvoare termale și sulfuroase, lacurile și mările hipersaline), precum și în cursul înfloririlor algale din mediile acvatice, care pot fi provocate adesea de o singură specie algală.

Esențiale pentru investigațiile autecologice și capabile să furnizeze informații foarte utile privind unele proprietăți fiziologice neabordabile în mediile naturale, rezultatele studiului culturilor pure trebuie confruntate obligatoriu cu observații efectuate în condiții de teren.

Între motivele principale în sprijinul acestui punct de vedere sînt de menționat cîteva exemple:

1) Diferențele de morfologie ale aceluiași organism în natură și în culturi de laborator sînt, uneori, atît de mari încît creează mari dificultăți în clasificare. Există numeroase exemple de microorganisme descrise ca specii distincte în natură și reduse la sinonimii după cultivare în laborator sau prin utilizarea unor tehnici moderne de identificare.

În acest sens sînt de menționat studiile lui Stanier, Rippka și colab. (1979), de sistematică a cianobacteriilor („algele" albastre-verzi), care au demonstrat că multe din cele peste 1 000 de specii (~ 150 de genuri) înscrise în Codul Botanic pe baza descrierilor morfologice aparțin categoriilor *nomina dubia, nomina confusa* sau *nomina perplexa*.

2) Marea variabilitate în timp a unor parametri importanți (t°, pH, grad de umiditate etc.) în mediile naturale poate induce importante modificări morfologice și funcționale.

Brock (1966) citează în acest sens cazul extrem al unei bacterii marine de tip *Arthrobacter*, studiată de Sieburth (1964), care și în culturi pure are două temperaturi optime: între 0 și 10°C crește micelioid și este Gram-negativă, în timp ce la 20°C este cocoidă și Gram-pozitivă. Transformările sînt reversibile prin simpla modificare a temperaturii mediului. Examinate direct prin metode microscopice, în medii naturale cu temperaturi diferite ele sînt greu de atribuit aceleiași specii. Exemplul este relevant atît pentru influența condițiilor de mediu, cît și pentru necesitatea culturilor pure.

## SISTEME COLONIALE ÎN MEDII ACVATICE

Numeroase bacterii au proprietatea de a reține descendenții pentru a forma diferite asocieri coloniale cu structuri caracteristice ca: tablete *(Lampropedia)*, colițe de timbre (bacteriile pătrate din genul *Quadra)*, rețele tridimensionale *(Pelodictyon)*, filamente *(Beggiatoa, Leucothrix)*, matrice *(Rhodomicrobium, Hyphomicrobium)*. În alte cazuri, asocierea este determinată de prezența unei teci comune *(Sphaerotilus)* sau prin inclavarea în polizaharide extracelulare *(Zoogloea ramigera)*.

Un caz particular este reprezentat de cianobacterii („algele" albastre-verzi), care formează filamente procariote, ce includ cel mai mare grad de specializare celulară prin prezența în structura filamentului a unor celule

morfologice și funcțional specializate (celule vegetative, heterochiști, akineți). În unele cazuri *(Anabaena)* au fost descrise conexiuni celulare, care sugerează unele particularități de procariote „multicelulare" (Dow și Whittenbury, 1983, 1989).

Mediile acvatice furnizează condiții particulare avantajoase pentru asocierea microorganismelor în sisteme coloniale. Capacitatea de asociere prin diferite mecanisme reprezintă un avantaj nutrițional în circumstanțe instabile de mediu, pentru că reține descendenții asociați într-o regiune limitată, nutrițional adecvată.

**Coloniile mobile.** Unele colonii mobile au proprietatea de a se deplasa pe suprafața mediilor de cultură solidificate cu o viteză de 0,5—1,4 rotații/oră. În cazul coloniilor mici, viteza de migrație poate ajunge pînă la 2,5 mm/minut.

Mișcarea coloniilor se poate efectua prin rotație în sensul acelor unui ceasornic (orar) sau antiorar. În unele cazuri, deplasarea se realizează lent și în linie dreaptă. Celulele care se deplasează lasă pe suprafața mediului o urmă corespunzătoare traiectoriei lor, sub forma unor șanțuri „săpate" în suprafața mediului.

Cu foarte rare excepții, mobilitatea coloniilor este întîlnită numai la bacili mobili cu spori deformanți ca: *Bacillus circulans*, *B. sphaericus* var. *rotans*, *Clostridium oedematiens*, *Cl. septicum* etc.

Mobilitatea coloniilor este determinată de prezența la celulele individuale a unui aparat flagelar puternic, capabil ca prin acțiune simultană să deplaseze o colonie întreagă ai cărei indivizi aderă slab de un mediu cu viscozitate mare (geloză) datorită unui potențial electric redus al suprafeței corpului bacterian. Acest fenomen, care nu pare să aibă importanță în condiții naturale, poate determina impurificarea culturilor în laborator, vehiculînd diferiți spori și bacterii pe suprafața mediului.

Mobilitatea coloniilor poate avea oarecare semnificație ecologică prin favorizarea deplasării coordonate a bacteriilor în căutarea unor noi surse de hrană.

BCU IASI / CENTRUL DE CARTE

# ADAPTAREA MICROORGANISMELOR LA ECOSISTEM

**„Adaptarea microorganismelor la un anumit mediu are loc deopotrivă la nivel genotipic și fenotipic și duce, pe de o parte, la organisme care au devenit înalt specializate și, pe de alta, la organisme foarte versatile, prin faptul că au un mare potențial de modificări fenotipice".**

W. HARDER
L. DIJKHUIZEN

Unul din faptele de observație unanim admise este acela că diferitele specii de microorganisme cresc, se multiplică, sînt active și supraviețuiesc între anumite limite de condiții externe, care reprezintă spectrul lor de toleranță sau *amplitudinea ecologică* (Alexander, 1971). Ceva mai mult, populațiile aceleiași specii pot avea limite de toleranță diferite. Populațiile unei specii care diferă ca toleranță pentru că s-au adaptat la circumstanțe locale diferite se numesc *ecotipuri*.

Unul din factorii cu importanță fundamentală pentru prezența microorganismelor în natură, chiar în cele mai puțin ospitaliere habitate, este reprezentat de marea capacitate de adaptare, ca răspuns la condiții noi, modificate, ale mediului. Frecvent, datorită particularităților specifice lumii microorganismelor, caracterele adaptative pot fi obscure sau exprimate subtil (Alexander, 1971). Consecințele prezenței lor, respectiv capacitatea speciei sau a tulpinii de a utiliza condițiile de mediu schimbate față de cele inițiale sînt însă foarte evidente.

Au fost descrise trei mecanisme de adaptare cu semnificație ecologică:

1) **Adaptarea fenotipică sau fiziologică** este temporară și ușor reversibilă. Ea are ca substrat capacitatea de modificare a echipamentului enzimatic, prin sinteza unor enzime noi, în urma procesului de inducție enzimatică, declanșat de prezența unor anumite substanțe în mediu. Acest tip de adaptare este corelat cu structura genetică normală a fiecărui microorganism, care determină natura enzimelor inductibile și spectrul limitat și variabil al reacțiilor chimice. Capacitatea de adaptare fenotipică este inegală: unele microorganisme au o deosebită plasticitate fenotipică, manifestată printr-un potențial de adaptare rapidă sau la o gamă largă de factori de mediu noi.

2) **Adaptarea genetică** are ca substrat existența unei populații neomogene, care conține mai multe variante de celule, cele mai multe cu un potențial de adaptabilitate fiziologică redusă. Inițial, s-a considerat că mecanismul molecular cel mai important ar fi reprezentat de producerea unor mutații, care permit apariția unor proprietăți noi, avantajoase. Practic, mutațiile apar cu o frecvență joasă, în mod continuu, dar în prezența condițiilor modificate, selecția lor ar fi favorizată datorită gradului lor superior de adaptare.

Rolul mutațiilor în acest proces este greu de estimat, mai ales că asigurarea unei modificări adaptative majore este condiționată de apariția

unor mutații avantajoase multiple, ceea ce este greu de imaginat în cazul aceleiași celule. Cel puțin pentru bacterii este cert că rolul major în adaptarea genetică revine plasmidelor și recombinării genetice consecutive transferului de informație (de gene) prin transformare genetică, transducție genetică, conjugare, hibridare de protoplaști etc.

Adaptarea genetică reprezintă un dezavantaj în cazul în care factorul de mediu care i-a favorizat apariția dispare. De altfel, în general, populațiile adaptate la anumite condiții de stres sînt dezavantajate cînd factorul determinant a dispărut. Acest fenomen pare să fie determinat de faptul că, cel mai adesea, procesul de adaptare este asociat cu unele modificări fiziologice ca, de exemplu, exigența pentru anumiți factori de creștere, diminuarea vitezei de multiplicare, capacitatea scăzută de competiție cu alte microorganisme sau cu forțele de apărare ale gazdei.

3) Modificarea cea mai importantă din punct de vedere ecologic a fost descrisă de Wuhrman (1964) sub denumirea de **„Sociological adaptation"**. Ea are la bază prezența în populațiile de microorganisme a unui număr foarte mic de celule, care, datorită modificărilor apărute în ecosistem, găsesc condiții foarte avantajoase de creștere și multiplicare, în așa fel încît devin dominante.

Existența lor este demonstrată de o serie de observații:

a) Populațiile de microorganisme prezente în stațiile de epurare a apelor uzate, indiferent de tipul lor (nămol activat, filtre percolatoare, digestoare anaerobe), au capacitatea de a degrada mai mult sau mai puțin rapid, practic, toate tipurile de substanțe cu care vin în contact. Această proprietate este nu numai consecința diversității speciilor de microorganisme, ci și a capacității enorme de adaptare la condițiile foarte variabile ale mediului.

b) Experimental s-a demonstrat că microorganismele din sol pot dobîndi capacitatea de a degrada diferitele pesticide cu care vin în contact, față de care sînt inițial inactive. Dovada existenței unui fenomen de adaptare este faptul că degradarea, inițial foarte lentă, devine mult mai rapidă după 2—3 săptămîni, chiar cînd concentrația pesticidelor este mai mare (fig. 5) (Whitside și Alexander, 1960).

c) Apariția și vindecarea proceselor de disbioză intestinală, induse de tratamentul oral cu antibiotice cu spectru larg, reprezintă un alt argument în favoarea ipotezei lui Wuhrman. Levurile sînt prezente constant în intestin și menținute la un număr foarte redus datorită competiției cu bacteriile, mai bine adaptate la mediul respectiv. Cînd numărul bacteriilor scade, sub influența antibioticului, levurile se înmulțesc excesiv, pentru ca să revină la densitatea anterioară cînd microbiota normală se reface, după încetarea tratamentului.

Capacitatea de adaptare a microorganismelor la condițiile noi din ecosistem a fost demonstrată și experimental pe două căi:

1) Prin transferul succesiv în serie, în medii cu concentrație progresiv mărită de substanțe microbiostatice, antibiotice, concentrație de $H^+$ etc. sau prin expunere la temperaturi progresiv crescînde. Astfel, Kushner și Lisson (1959) au reușit să adapteze o tulpină de *Bacillus cereus* prin 111 subculturi în serie, în medii cu alcalinitate mărită de la pH 9,0 pînă la pH 10,3, într-o perioadă de 60 de zile.

2) Prin expunerea unei populații mari de microorganisme, o perioadă îndelungată de timp (cîteva luni), la condiții neobișnuite, pentru a permite

selecția și multiplicarea unor variante preexistente în populație, capabile să competiționeze cu condițiile de mediu modificate.

Adaptarea la condiții noi de mediu și achiziția de proprietăți noi este frecvent asociată cu pierderea unor caractere vechi și cu modificări consecutive în biologia microorganismelor respective. Uneori, aceste modificări

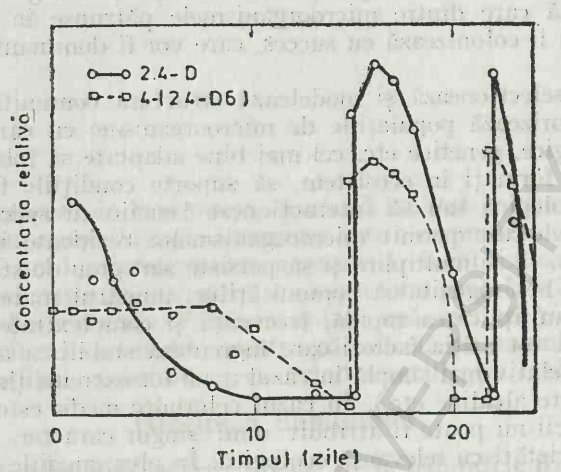



Fig. 5. — Îmbogățirea solului cu bacterii capabile să utilizeze 2,4-D(2,4-diclorfenoxiacetat) și 4-(2,4-DB) (4-diclorfenoxibutirat) grăbește viteza de dispariție a substanțelor respective aplicate în soluție ca surse de carbon. După prima aplicare, cele două substanțe sînt degradate lent, în timp ce după aplicarea a două și a treia (după 14 și respectiv 21 de zile), viteza de degradare este mult mai mare (după Whiteside, 1960).

sînt atît de mari încît pot determina incapacitatea de a se multiplica în mediul originar. Situația este tipică în cazul unor agenți patogeni, care inoculați în serie la animale de laborator își pierd patogenitatea pentru gazda originară. În mod asemănător, cultivarea lor în serie pe medii artificiale este însoțită de atenuarea și, final, de pierderea totală a virulenței. Fenomene de acest gen au fost descrise în cazul mai multor specii patogene (*Bacillus anthracis*, *Clostridium* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Xanthomonas* sp. etc.).

## SELECȚIA MICROORGANISMELOR ÎN ECOSISTEM

Microorganismele ca grup au un caracter ubicvitar, evidențiat prin prezența lor în mediile naturale cele mai insolite, precum și o serie de proprietăți care sugerează o mare adaptabilitate și un potențial mare de multiplicare și colonizare. Cu toate acestea, ecosistemele individuale sînt populate de comunități de microorganisme caracteristice. Studiul microbiotei diferitelor medii naturale (sol, ape dulci și marine, suprafața frunzelor, rădăcinile sau semințele plantelor, microbiota intestinală a diferitelor specii animale

etc.) demonstrează, fără echivoc, că distribuția microorganismelor nu este aleatorie. Unele specii sînt prezente în anumite localizări și complet absente în altele. Chiar după o examinare sumară este evident că fiecare ecosistem individual este asociat cu anumite particularități fizice, chimice și biologice și că acestea guvernează compoziția comunităților biologice ce le populează. Ele determină care dintre microorganismele pătrunse în mediul respectiv se stabilesc și îl colonizează cu succes, care vor fi dominante sau care vor fi îndepărtate.

Mediul selecționează și modelează structura comunității biologice, în sensul că favorizează populațiile de microorganisme cu caracteristici morfologice, fiziologice, genetice etc. cel mai bine adaptate să folosească nutrienții introduși sau formați în ecosistem, să suporte condițiile fizico-chimice, de competiție biologică sau să interacționeze benefic cu speciile preexistente.

Caracterele care permit microorganismelor rezidente într-un ecosistem să-l colonizeze, să se multiplice și să persiste sînt greu de stabilit. Dimensiunile lor mici, heterogenitatea comunităților, numărul mare al organismelor individuale, multiplicarea rapidă, frecvența și complexitatea interacțiunilor etc. reprezintă tot atîția factori care îngreuiază stabilirea acestor caractere. Situația este relativ mai simplă în cazul mediilor extreme (hipersaline, foarte acide sau foarte alcaline etc.). În cazul celorlalte medii este evident că succesul unei specii nu poate fi atribuit unui singur caracter, ci unei multiplicități de proprietăți cu relevanță ecologică. În plus, mediile naturale sînt, de regulă, foarte schimbătoare. Modificarea unui factor de mediu semnificativ influențează densitatea populațiilor sensibile, determină dominanța speciilor favorizate de schimbare și diminuarea, uneori pînă la dispariție, a celor neadaptate ei.

Efectele asupra speciilor individuale sînt variabile în funcție de durata schimbării. În cazul modificărilor tranzitorii (cum sînt cele determinate de variațiile sezoniere ale unor condiții în mediile acvatice sau antibioterapie) se observă revenirea microbiotei la normal. În cazurile în care modificarea se menține mult timp, se instalează o nouă comunitate. Acest fenomen stă la baza succesiunii populațiilor în ecosistem, prin care remodelarea comunităților de microorganisme este determinată de mediu și în acord cu mediul. Remodelarea constă în favorizarea populațiilor cu adaptare superioară la condițiile modificate prezente în mediu, care devin dominante. Speciile mai puțin favorizate trec pe un plan secundar, iar cele care nu tolerează condițiile modificate dispar. Final, există tendința spre o stare de stabilitate — *stadiul de climax* — în care populațiile de microorganisme prezente în ecosistem sînt cele care au fost selecționate natural ca fiind în maximă armonie cu mediul.

Deși particularitățile mediului determină natura populațiilor de microorganisme ce pot ocupa un habitat, relația nu este unidirecțională. La rîndul lor, microorganismele modifică, uneori considerabil, proprietățile fizico-chimice ale mediului, prin activitatea lor în ecosistem. Unele modificări sînt benefice (rolul în formarea solului, în circuitul materiei și energiei în natură etc.), altele negative (biodeteriorare, „înfloriri algale", infecții ale plantelor, omului și animalelor etc.).

# CONCEPTELE DE HABITAT ȘI NIȘĂ

Ecologii folosesc, în mod uzual, termenii habitat și nișe pentru a caracteriza poziția unei populații de organisme într-o comunitate.

Habitatul unui microorganism reprezintă locul în care trăiește, se reproduce sau cel puțin supraviețuiește, respectiv o zonă fizică sau o anumită parte specifică din suprafața Pămîntului (sol, apă, aer etc.). Este un termen mai specific decît cel de mediu, pentru că reflectă un anumit grad de omogenitate, în condițiile considerate ca avînd semnificație ecologică.

## Mărimea habitatelor

Mărimea habitatelor variază imens: de la habitatele foarte mari (oceanul) la mari (cîmpia), mici (resturi vegetale pe cale de descompunere) sau foarte mici (intestinul unei insecte).

Numărul habitatelor este, de asemenea, imens, deoarece puține regiuni de pe suprafața planetei sînt lipsite de microorganisme.

Natura habitatelor este, de asemenea, variabilă, incluzînd solul, apele dulci și marine, aerul, asocierile epi- sau endosimbiotice cu alte microorganisme, cu plantele și animalele.

Caracteristicile fizice, chimice și biologice ale habitatului influențează multiplicarea, activitatea, supraviețuirea și interacțiunile microorganismelor din interiorul lui.

Pentru microorganisme, un rol cu importanță considerabilă îl au nu numai caracteristicile globale ale habitatului, în general, ci, mai ales, particularitățile *microhabitatului* în care trăiesc.

Wimpenny (1981) critică termenul de habitat, deoarece ilustrează un concept pasiv, care poate fi definit în funcție de compoziția unei anumite poziții a organismului în spațiu. Cu alte cuvinte, nu spune nimic despre rolul organismului în spațiul respectiv.

## Microorganismele din habitat

Raportat la sol ca habitat, Winogradsky a împărțit microorganismele în următoarele categorii:

**Microorganismele autohtone** („microflora"* normală, permanentă, autohtonă, endogenă, nativă sau indigenă) sînt caracteristice unui anumit

* Termenul de *microfloră*, folosit curent în unele lucrări de ecologia microorganismelor este perimat și incorect, deoarece, cu excepția microalgelor, nici una din categoriile mari de microorganisme nu aparțin lumii plantelor. Bacteriile aparțin regnului *Procariotae* (*Monera*), microfungii regnului *Fungi*, iar protozoarele regnului *Protista* sau, după clasificări tradiționale, regnului animal.

tip de sol. Ele sînt adaptate la viața în solul „normal", adică în solul care nu conține substanțe organice în curs de descompunere prin fermentație sau putrefacție, ci, substanțe aduse într-o stare relativ stabilă, așa cum sînt substanțele humice. Datorită caracteristicilor lor adaptative, aceste microorganisme sînt compatibile cu mediul lor fizic și chimic *în care sînt funcționale* (cresc, desfășoară activitate metabolică și sînt competitive cu alte organisme vii prezente în același habitat).

**Microorganismele alohtone** („microflora" temporară, accidentală, străină sau zimogenă) sînt microorganisme prezente temporar în sol, fără a ocupa nișe funcționale în structura acestuia. Ele cresc în altă parte, sînt străine de sol, în care apar, spre exemplu, ca urmare a unor tratamente agrotehnice (în cazul adăugării unor îngrășăminte animale, ca gunoiul de grajd, microorganismele proprii acestuia). Supraviețuirea lor în sol este variabilă. De regulă, se înmulțesc cînd solul primește diferite substanțe organice și dispar treptat pe măsură ce substanțele respective sînt descompuse.

Ecosistemele microbiene din natură sînt dinamice și expuse unor schimbări continue. În unele cazuri, în special în ecosistemele expuse unui stres sau unor perturbări, unele microorganisme alohtone pot supraviețui, se pot multiplica, rămînînd metabolic active. Ele pot ocupa anumite nișe disponibile și, în anumite condiții, pot chiar deveni autohtone (Atlas și Bartha, 1987).

Periodic li se adaugă, uneori, o **„microfloră" de tranziție**, reprezentată de microorganisme zoo- sau fitopatogene, care, cel mai adesea, nu găsesc condiții de multiplicare, ci numai de supraviețuire temporară, în funcție de factorii de mediu și de eventualitatea întîlnirii cu specia-gazdă.

Distincția dintre caracterul autohton sau alohton este frecvent foarte greu de făcut. Clasificarea, contestată de unii cercetători, este totuși aplicabilă și altor tipuri de habitate.

## MICROHABITATUL

Microorganismele trăiesc în microhabitate („Microenvironments") definite, cu dimensiuni milimetrice sau frecvent micrometrice. Fenomenul este determinat de marea heterogenitate spațială a mediilor naturale. Această particularitate este consecința faptului că în natură există frecvent o serie de gradiente, uneori foarte marcate, alteori subtile (și mai greu sesizabile) ale unor parametri cu rol esențial în creșterea și supraviețuirea microorganismelor. Ele crează o lipsă de uniformitate a condițiilor microecologice, chiar între regiuni foarte apropiate, sub raportul concentrației și tipului de substanțe organice și anorganice, condițiilor de pH și $E_h$, gradului de iluminare și umiditate, presiunii osmotice, concentrației gazelor dizolvate (în special $O_2$ și $CO_2$), a substanțelor toxice sau inhibitoare etc.

Această heterogenitate a condițiilor fizico-chimice, care diferențiază regiuni microscopice foarte apropiate, creează condiții de microcosmos favorabile pentru anumite specii și intolerabile pentru altele. Ca urmare, mediile naturale prezintă o *distribuție spațială discontinuă* a microorganismelor, consecință a unui mozaic de microhabitate, fiecare capabil să adăpostească populații de microorganisme diferite, în funcție de condițiile locale. Chiar un grăunte de nisip marin (fig. 6) poate prezenta mai multe microhabitate în care unele zone, acoperite de microcolonii de eubacterii, cianobacterii, alge, sînt separate de regiuni lipsite de microorganisme.

Solul, mediu natural caracterizat printr-o heterogenitate foarte marcată, determinată de diferențele mari din punct de vedere fizico-chimic chiar pentru regiuni foarte mici prezintă un grad deosebit de important de diversitate sub raportul localizării diferitelor microorganisme. Ca urmare, un mic agregat de sol conține un număr mare de microhabitate. Examenul microscopic a demonstrat că bacteriile nu se dezvoltă în continuitate în structura lui, ci sub formă de microcolonii net separate unele de altele în matricea solului sau chiar sub formă de celule independente (fig. 4, Jones și Griffiths, 1964).

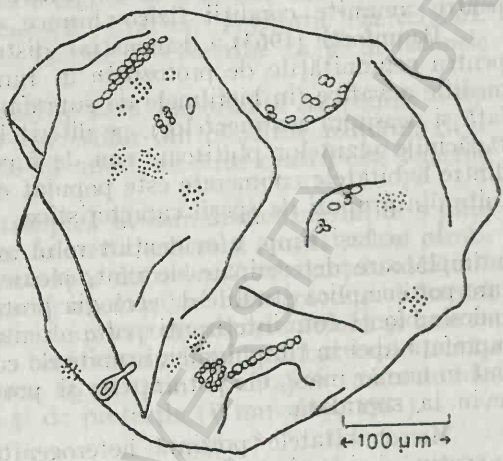



Fig. 6. — Distribuția microorganismelor pe suprafața unei particule de nisip marin (după Meadows și Andersen, 1968).

Numeroase exemple demonstrează rolul concentrației $O_2$ în structura specifică a microhabitatelor. În situsurile bogate în substrate degradabile, în care nevoia de $O_2$ liber este mare, iar difuzia lui este îngreuiată, prezența microorganismelor aerobe creează micrositusuri anaerobe, imediat adiacente localizărilor în care $O_2$ se găsește în cantități importante. În aceste condiții, microorganismele obligat anaerobe găsesc microhabitate foarte apropiate de zonele aerobe, iar procesele metabolice dependente de $O_2$ se desfășoară, aparent, în aceeași regiune cu cele ce funcționează numai în absența $O_2$ liber. În aceste microhabitate, *Clostridium* sp. poate coexista cu bacterii sau cu fungi obligat aerobi, iar oxidarea $NH_3$ în aerobioză poate avea loc în aceeași localizare cu denitrificarea $NH_3$ la $N_2$, reacție normal inhibată de $O_2$.

**Determinarea localizării și limitelor microhabitatelor** este relativ simplă în cazul microorganismelor legate de un substrat solid (rocă, rădăcinile plantelor submerse, mucoasa organismelor animale sau chiar pe alte microorganisme). Bacteria *Leucothrix mucor* are ca microhabitat alga *Callophyllis hacmophylla*.

În mod asemănător, microhabitatul bacteriilor heterotrofe dezvoltate pe suprafața cianobacteriilor este ușor de determinat, ca și cel al bacteriei *Sphaerotilus natans*, legată de masele de mucus formate în apele poluate.

În schimb, rădăcinile plantelor nu sînt colonizate de un manșon continuu bacterian, cum s-a crezut inițial, ci de colonii și microcolonii separate de regiuni sterile, în funcție de localizarea și de concentrația substanțelor organice din exsudatul radicular, separate de țesut neinfectat. Tractul intestinal al unui mamifer nu reprezintă un habitat, ci sediul unui număr foarte mare de microhabitate.

Situația este în mod particular dificilă în cazul organismelor libere din mediile acvatice, care pot fi deplasate sau concentrate la distanțe mari de habitatul lor real, fie pasiv (prin acțiunea valurilor, curenților, vîntului), fie activ (prin mobilitate sau prin modularea conținutului veziculelor cu

gaze). În aceste medii există o zonare atît pe verticală, cît și pe orizontală reflectată atît în distribuția neuniformă a algelor, cît și a bacteriilor fotosintetizante. S-a demonstrat o stratificare pe verticală a acestora în funcție de natura pigmenților și deci de lungimea de undă și intensitatea luminii, precum și o distribuție caracteristică pe orizontală (preferința unor microorganisme pentru regiunile de coastă, pentru roci intermitent scăldate de apă, pentru anumite condiții fizico-chimice etc.).

Baumforth (1963) a demonstrat distribuția specifică a microhabitatelor pentru comunitățile de protozoare în funcție de poziția lor pe verticală în mediile acvatice (în biofilmele de suprafață, în apele deschise (în sub-suprafață și deasupra sedimentelor), pe diferitele structuri submerse (mase algale, rădăcinile plantelor plutitoare sau de fund aproape de sedimente). Fiecare dintre habitatele enumerate este populat de comunități de protozoare alcătuite din grupuri de specii caracteristice.

În același timp, a evidențiat rolul modificărilor diurne și al migrărilor întîmplătoare determinate de vînt, ploaie, deplasarea animalelor mari etc. care pot complica studiile de ecologia protozoarelor. În plus, protozoarele cu endosimbionți fotosintetizanți pot prezenta deplasări diurne de ridicare la suprafața apei în timpul zilei, urmate de coborîre după apusul soarelui. Dacă sînt în număr mare, ele pot antrena și protozoarele „incolore", care noaptea revin la suprafață.

Microhabitatele prezintă heterogenitate și discontinuități nu numai în spațiu, ci și în timp. În cazul unor modificări severe, determinate de cauze fortuite, independente de microbiota proprie, speciile indigene se pot confrunta cu circumstanțe noi, foarte diferite de cele existente inițial, cu care uneori nu pot competiționa. În aceste condiții, anumite variante mai competitive din microhabitat sau unele microorganisme din exterior pot dobîndi un avantaj selectiv, devenind dominante, și ocupă microhabitatul, fiind la baza fenomenelor de succesiune.

Localizarea microorganismelor în teritorii extrem de limitate într-un mediu natural are repercusiuni foarte importante pentru studiile de ecologia microorganismelor, deoarece influențele microhabitatelor asupra componenților abiotici ai mediului sînt, în general, neînsemnate. Spre exemplu, microhabitatul reprezentat de o particulă coloidală de argilă, a cărei suprafață este încărcată electronegativ, are un pH mult mai mic, datorită fixării de $H^+$, decît soluția din jur. Celula bacteriană care aderă de această suprafață trăiește într-un mediu mai acid decît arată determinările de pH ale mediului înconjurător, măsurat în general în cercetările de ecologie. În consecință, rezultatele măsurătorilor de pH, potențial redox, concentrația $O_2$ dizolvat, concentrația de săruri sau de nutrienți, determinate la macroscară sînt nerelevante pentru particularitățile fizico-chimice ale microhabitatului. Ele induc în eroare cercetătorii preocupați de procesele microbiene predominante în habitat.

## INTERACȚIUNILE DINTRE HABITATE

Wimpenny (1981) atrage atenția asupra faptului că habitatele microorganismelor nu sînt izolate, ci pot coexista realizînd, în unele cazuri, reacții ciclice cu diferite grade de complexitate între medii diferite. Altfel spus,

microorganismele care în mod normal nu pot ocupa același spațiu, se influențează reciproc prin activitățile lor chimice, asigurate de difuzia substanțelor solubile.

Una din formele cele mai simple corespunde interacțiunii dintre bacteriile sulfoxidante și cele complet diferite, sulfat reducătoare, (fig. 2A). Situate la granița dintre unele habitate aerobe și anaerobe sînt total dependente de compușii sulfului, care difuzează dintr-un „teritoriu" în celălalt. Situația este întîlnită în sedimentele marine și estuarine ca și în bazinele acvatice stratificate.

Un alt exemplu, citat în special pentru importanța sa pentru fertilitatea solurilor agricole, este cel al bacteriilor din circuitul azotului. El se realizează în cazul bulgărilor mari de sol umed, al căror centru este anaerob (fig. 2B).

În sfîrșit, un exemplu și mai complex în care discontinuitățile solului asigură legarea metabolismului unor bacterii anaerobe cu al celor aerobe este prezentat în fig. 2C. Bacteriile anaerobe degradează substanțele alcătuite din polimeri insolubili, le supun unor fermentații ai căror produși difuzează în regiunile aerobe. Aici sînt preluate de microorganismele aerobe și convertite la $CO_2$ și $H_2O$. Fenomenul este benefic prin faptul că bacteriile aerobe detoxifică habitatul prin îndepărtarea $O_2$ și prin avantajele mutuale decurgînd din furnizarea de nutrienți și de protecție (Wimpenny, 1981).

## CONCEPTUL DE NIȘĂ ECOLOGICĂ

A fost introdus, după unii autori, de Johnson (1910), după alții, de Grinaell (1917). Spre deosebire de habitat, conceptul de nișă este mai larg, descriind nu numai unde trăiește un organism, ci, de asemenea, și ceea ce face. El definește, deci, rolul funcțional sau activitatea unui organism într-un habitat, în funcție de adaptările structurale, de activitatea fiziologică și de comportamentul organismelor.

Conceptul de nișă este, totuși, mult mai contradictoriu datorită opticii particulare a diferiților cercetători, fapt reflectat și în numeroasele accepții existente în prezent și încercări de definire*.

Odum (1971) include în conceptul de nișă nu numai spațiul ocupat de un organism, ci și rolul său funcțional în comunitate (poziția sa trofică în raport cu gradienții de temperatură, pH, umiditate etc.). Într-o formulare sugestivă, după Odum, habitatul definește localizarea (domiciliul) organismului, în timp ce termenul de nișă se referă la funcția lui în habitat, la profesiunea lui.

---

* Nișa = unitatea de distribuție („Distribution unit") a speciei, dependentă de resursele de hrană și de factorii abiotici (Gaffney, 1975; Gall, 1979; Botnariuc și Vădineanu, 1982).

Nișa = locul pe care-l ocupă o specie într-o comunitate (biocenoză) și, în primul rînd, relațiile ei cu hrana și cu dușmanii (Grinaell, 1918; 1928; Botnariuc și Vădineanu, 1982).

Nișa = rolul populației în procesul de transfer al materiei și energiei, deci funcția ei trofică (Elton, 1927; Botnariuc și Vădineanu, 1982).

Nișa = rolul ecologic al unei specii într-o comunitate; conceptualizat ca un spațiu multidimensional, ale cărui coordonate sînt diferiții parametri ce reprezintă condiția de existență a speciei la care ea este limitată prin prezența speciilor competitoare. Uneori utilizat în sens larg (cronat), ca echivalent al microhabitatelor, în sens de spațiu fizic ocupat de o specie (Lincoln, Boxshall și Clark, 1982).

Odum deosebește trei tipuri diferite de nișe:

1) nișă-habitat („Habitat niche"), corespunzînd spațiului fizic ocupat de un anumit organism;

2) nișă trofică („Trophic niche"), corespunzînd setului particular de caracteristici nutriționale ale unui organism; rolul său în procesul de transfer al materiei și energiei;

3) nișă multidimensională („Hypervolume niche").

Conceptul de nișă multidimensională, după Wimpenny (1981), cel mai relevant pentru studiile de ecologia microorganismelor a fost formulat de Hutchinson (1957, 1965). El are la bază premisa că o definiție exactă indică considerarea nișei ca un hiperspațiu în care fiecare coordonată ($X_1$, $X_2$, $X_3$...) corespunde unei variabile importante pentru viața speciei. Pe această bază poate fi construit un hipervolum, în care fiecare punct corespunde la un set de valori ale variabilelor ce permit existența organismului respectiv.

Țelul lui Hutchinson în elaborarea acestei definiții a fost de a formaliza *principiul excluderii competitive* („Competitive exclusion") după care, în absența competiției, un organism poate avea o *nișă fundamentală* sau *potențială**, iar în prezența altor specii cu care competiționează o *nișă efectivă* sau *realizată***. Principiul excluderii competitive afirmă că niciodată două specii cu proprietăți ecologice identice nu pot ocupa simultan aceeași nișă efectivă. Mai devreme sau mai tîrziu, una dintre ele este îndepărtată. Principiul este ilustrat de experiența lui Gause (1934), de cultivare a două specii de protozoare, *Paramecium aurelia* și *P. bursaria (caudatum)*, într-un spațiu finit și în prezența unei cantități limitante de nutrienți (fig. 7). Ea demon-

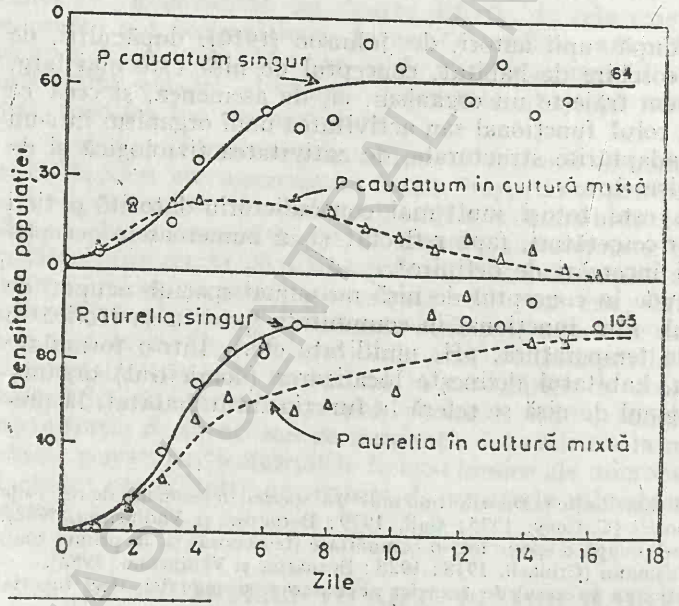



Fig. 7. — Reprezentarea schematică a efectelor competiției dintre două specii de *Paramecium* strîns înrudite, care au nișe identice. Cultivate separat, în prezența unor cantități adecvate de bacterii ca sursă de hrană, ambele specii se dezvoltă bine. Cultivate în asociere, *P. caudatus* este eliminat (după Alee și colab., 1949).

* *Nișa fundamentală* = întregul spațiu multidimensional care reprezintă spectrul total de condiții în care un organism poate funcționa și pe care îl poate ocupa în absența altor specii cu care pot competiționa sau interacționa (ecospațiu) (Lincoln, Boxshall și Clark, 1982).

** *Nișa realizată* = parte din nișa fundamentală, efectiv ocupată de o specie, în prezența speciilor cu care competiționează sau cu care interacționează (Lincoln, Boxshall și Clark, 1982).

strează că cele două specii nu pot coexista, *P. bursaria* fiind eliminată din mediu. Este de menționat că principiul lui Gause pare să nu aibă caracter de universalitate, datorită intervenției și a altor factori care influențează coexistența speciilor în aceeași nișă fundamentală.

Studiile de Ecologia microorganismelor, între altele, oferă numeroase exemple în care habitate foarte bogate în nutrienți permit coexistența unor specii cu exigențe nutriționale identice sau foarte apropiate.

Ca rezultat al adoptării conceptului de nișă ecologică a microorganismelor, distincția netă dintre microbiologia acvatică, terestră sau medicală își poate pierde din semnificație (Schlegel și Jannasch, 1981; Stewart, 1983).

## COMPARTIMENTUL ȘI DOMENIILE

Cele două concepte — habitat și nișă — tradiționale pentru Ecologia generală au fost criticate în ultimii ani în ceea ce privește utilizarea lor în Ecologia microorganismelor, în special pentru faptul că nu țin seama, în mod precis, de coordonate spațiale și temporale.

După Wimpenny (1981), descrierea habitatului spune simplu că o anumită localizare răspunde anumitor limite fizicochimice adecvate pentru creșterea unui organism specific. Conceptul de nișă este inacceptabil pentru Williamson (1972), ca și pentru Emlen (1973), din cauza confuziei care înconjură semnificația sa, decurgînd, în special, din faptul că include două categorii de date: factori de habitat și factori de nișe. Nici una din definițiile existente nu stabilește granițele reale ale nișei.

După Cohen (1978) „nișa trebuie concepută ca o regiune în spațiul habitatului și nu în mod obligatoriu ca o regiune direct observabilă în spațiu și timp (în cursul succesiunii ecologice)". El exemplifică această definiție cu cazul bacteriilor sulfat reducătoare, care ocupă un habitat ce poate fi descris în termeni fizicochimici ca o zonă în care are loc reducerea sulfatului la sulfuri și în care condițiile de pH, $E_h$, natura și concentrația nutrienților sînt adecvate acestei acțiuni specifice. Este evident că această descriere a nișei nu dă nici o informație asupra mărimii regiunii din jurul celulei sau al celulelor care îndeplinesc această funcție și în care activitatea lor este încă exprimată în mod semnificativ (Wimpenny, 1981).

Aceste „slăbiciuni" ale conceptelor de habitat și nișă au devenit evidente, în special, în ultimii ani, în context cu încercările de determinare cantitativă a creșterii și a metabolismului microorganismelor, precum și a interacțiunilor lor în ecosistemele microbiene structurate. Concluzia acestui demers este că valoarea modelelor cantitative este condiționată de utilizarea unor definiții operaționale mai riguroase.

## CONCEPTELE DE COMPARTIMENT ȘI DOMENIU

Wimpenny (1981, 1984) a propus două concepte noi, pe care le consideră ca avînd proprietăți bine definite și semnificații foarte nete și prin aceasta menite să satisfacă exigențele de precizie ale abordărilor cantitative în ecologia microorganismelor.

Ținînd seama de importanța și noutatea lor, precum și de circulația încă restrînsă a informației, le redăm în detaliu:

## Compartimentul

Compartimentul este o unitate fiziologică (funcțională) avînd limite discrete, care separă spații distincte din punct de vedere fizicochimic. În termeni ecologici, poate fi sinonim cu „celula", deși poate fi extins la unități mai mici sau mai mari. Astfel, la limita inferioară termenul de compartiment poate fi atribuit centrului activ al unei enzime, complexelor multienzimatice, organitelor subcelulare (nucleu, mitocondrii, lizosom, cloroplaste etc.).

La limita opusă (superioară), termenul de compartiment poate defini asocieri multicelulare (ca, de exemplu, coloniile microorganismelor, biofilmele microbiene) sau chiar asocierilor multicelulare de tipul organelor sau organismelor multicelulare.

Din punctul de vedere al ecologiei microorganismelor, compartimentul cel mai comun este microorganismul unicelular, delimitat de învelișurile sale externe, dintre care un rol fundamental revine membranei plasmatice, prin intermediul căreia se stabilesc și se mențin gradiente nete de substanțe solubile.

## Domeniul

În concepția lui Wimpenny, domeniul corespunde unui spațiu extern cu care compartimentul interacționează, respectiv un teritoriu asupra căruia acesta exercită o anumită influență fizico-chimică. Această influență poate avea originea în mediu *(domeniu de habitat)* sau poate fi determinat de compartimentele din acel habitat *(domeniu de activitate)*. În acest context, compartimentul acționează fie pentru a crește concentrația substanțelor solubile, fie pentru a o diminua (spre exemplu, prin consum). Din aceasta rezultă că în formularea acestor concepte, Wimpenny acordă o importanță majoră fluxului vectorial al substanțelor solubile. Teoretic, domeniul poate să nu aibă nici o graniță formală. În mod operațional, limitele unui domeniu sînt marcate de granița de la care o anumită activitate ajunge la o valoare nesemnificativă (respectiv, corespunzătoare celei prezente în mediul situat în afara zonei de influență a compartimentului).

Noțiunea de **domeniu de habitat** poate fi ilustrată de stratul superior, gros de 30—40 μm al unei colonii bacteriene care se dezvoltă în aerobioză sau de stratul gros de cîțiva milimetri mai oxigenat de la suprafața mîlului dintr-un estuar. În funcție de direcția fluxului de substanțe dizolvate domeniile de habitat pot fi domeniu-sursă sau domenii de diminuare a concentrației acestora.

Termenul de **domeniu de activitate** definește zona de „iradiere" prezentă în jurul tuturor celulelor care cresc sau cu alte cuvinte zona în care un metabolit poate difuza din compartiment.

Wimpenny (1981, 1984) ilustrează posibilitatea utilizării conceptelor de compartiment și domeniu cu o situație concretă referitoare la un sistem în care singurul factor răspunzător de translocația substanțelor solubile este difuzia lor.

1) În figura 8a, liniile punctate marchează limitele domeniului de activitate, în timp ce domeniul de habitat este reprezentat schematic ca o suprafață ce înconjoară compartimentul.

Compartimentele pot fi localizate fie numai în propriile lor domenii, fie în domeniile altor compartimente. Fiecare domeniu poate avea după caz un efect pozitiv sau negativ, ori neutru față de compartimentul localizat în interiorul său.

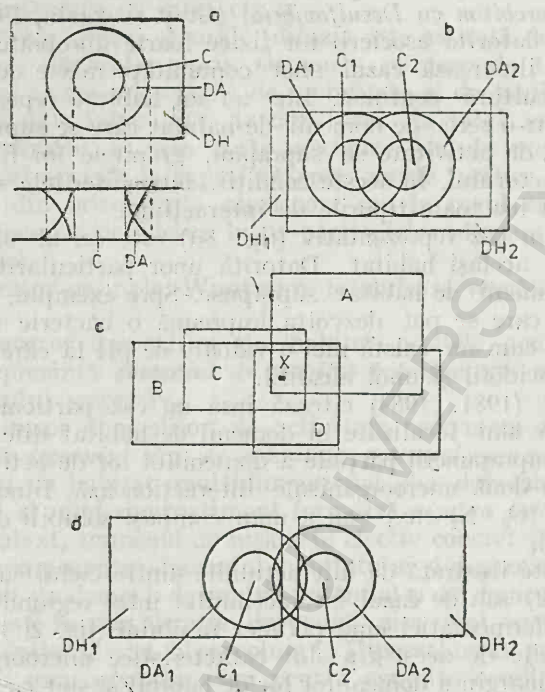



Fig. 8. — Compartimentul (C) și domeniile de activitate (DA) și de habitat (DH) (a). b. Compartimentele $C_1$ și $C_2$ ce interacționează avînd domenii de habitat și de activitate ce se suprapun. c. Comunitate mixtă de microorganisme care crește în condiții omogene (x), în domenii de habitat comune. d. Compartiment cu domenii de habitat complet diferite, care interacționează datorită suprapunerii parțiale a domeniilor de activitate (după Wimpenny, 1984).

Situația este exemplificată cu o bacterie care produce un metabolit care inhibă propria sa creștere (producerea unor acizi organici și scăderea pH de către o bacterie fermentativă). Prezența unei posibilități de scădere a concentrației acestora (prin neutralizare, utilizare sau degradare) suprimă inhibarea creșterii bacteriei producătoare.

Un alt exemplu este cel al microorganismelor anaerobe ce pot fi prezente într-un domeniu de habitat oxigenat. Or, mulți anaerobi pot reduce $O_2$ la $H_2O$ fie direct, fie via $H_2O_2$ și prin aceasta diminuă concentrația de $O_2$.

2) Compartimentele care ocupă același domeniu de habitat sau domenii de habitat diferite pot interacționa eficient dacă domeniile lor de activitate se suprapun parțial, asigurînd dezvoltarea unor specii diferite în același spațiu, datorită unor condiții numai parțial comune. Figura 8b reprezintă schematic

un caz de interacțiune între două compartimente celulare diferite datorită suprapunerii domeniilor lor de activitate. În natură, situația este ilustrată de cazul bacteriilor *Methanobacillus omelianskii* (în realitate, un cuplu de două bacterii diferite, denumite „H" și „S") (vezi cap. „Asociația sintrofică") și *Chloropseudomonas ethylica* (de asemenea o asociere simbiotică între o specie de *Chlorobium* cu *Desulfovibrio*) (Gray și colab., 1973). Ele interacționează strîns datorită asocierii lor fizice foarte apropiate.

Figura 8c ilustrează cazul unor comunități mixte de microorganisme în condiții de cultură continuă. Ele au un habitat reprezentat printr-un singur punct, într-o serie de domenii de habitat care se suprapun. În același timp, domeniile de activitate se suprapun, granițele lor fiind reprezentate de pereții bioreactorului. În aceste condiții, între diferitele specii ale consorțiului* pot avea loc toate tipurile de interacțiuni.

3) Un ultim caz reprezentativ (fig. 8d) este cel al organismelor care nu pot coloniza același habitat. Datorită unor particularități specifice ele nu pot avea domenii de habitat suprapuse. Spre exemplu, nu există nici o temperatură la care se pot dezvolta împreună o bacterie termofilă și una psihrofilă, după cum nu există nici o valoare de pH la care pot coexista un microorganism acidofil și unul alcalifil.

Wimpenny (1981, 1984) citează însă un caz particular, în care deși microorganismele sînt localizate în domenii de habitat diferite pot interacționa datorită suprapunerii parțiale a domeniilor lor de activitate (fig. 8d). Altfel spus, cele două microorganisme interacționează, fiind legate prin difuzia unor gaze ($O_2$, $N_2$ etc.) sau a unor compuși solubili dintr-un compartiment într-altul.

Situația este ilustrată de interacțiunile dintre ciclul sulfului (fig. 2*A*), azotului (fig. 2*B*) sau de cazul interacțiunilor între regiunile aerobe și anaerobe în cursul fermentației unui polimer insolubil (fig. 2*C*).

Interacțiunile de acest tip sînt caracteristice microorganismelor care ocupă poziții la marginea domeniilor lor de habitat și sînt cu atît mai intense cu cît apropierea fizică este mai mare.

Ele sînt caracteristice ecosistemelor acvatice stratificate în care se înregistrează un gradient brusc al concentrației $O_2$, precum și interfețelor apă/mîl.

În mîlul estuarelor s-a descris frecvent existența unui strat de bacterii sulfoxidante (la interfața cu coloana de apă), localizate pe un strat subțire de bacterii sulfat reducătoare. Cele două straturi bacteriene interacționează ca un transductor chimic prin care $O_2$, $CO_2$ și substanțele organice reducătoare sînt consumate pentru sinteza de celule noi. În acest proces, compușii sulfului acționează catalitic pentru a conecta metabolismul celor două specii bacteriene prin difuzie.

Pentru înțelegerea interacțiunilor dintre compartimente și domenii, Wimpenny (1981, 1984) insistă asupra unor particularități esențiale:

1) Interacțiunile dintre un compartiment și domeniul său de habitat sau între două sau mai multe compartimente dintr-un ecosistem structurat se realizează prin fluxul vectorial al substanțelor solubile de la regiunile „sursă" spre cele în care concentrația lor scade.

---

* *Consorțiu* — grup de microorganisme aparținînd unor specii diferite, care trăiesc în strînsă asociere.

2) Reacțiile vectoriale apar prin difuzie sau prin difuzie asistată de sisteme mecanice sau de sisteme moleculare de transport activ.

3) Difuzia este un proces lent și ineficient, deoarece poate fi influențată de o serie de factori (coeficientul de difuzie al substanțelor, temperatură, natura mediului, apropierea de sursă etc.).

4) În multe ecosisteme naturale, difuzia este asistată de diferite mecanisme: a) la nivel molecular, prin sistemele celulare de transport activ; b) la nivel celular și/sau organismic de mobilitate și de taxii, care dirijează organismele în direcția favorabilă „la deal" sau „la vale" în raport cu gradientul de concentrație; c) prin forțe mecanice (ca, de exemplu, în cazul solului) prin fluxul apei de la suprafață spre zonele freatice, care poate antrena nutrienții din orizonturile superioare sau în cazul capilarității care determină translocația lichidelor între particulele adiacente de materiale particulate din sol.

Pe baza acestor exemple, Wimpenny formulează următoarele concepte fundamentale:

1) Suma tuturor domeniilor de habitat posibile pentru un anumit compartiment reprezintă *domeniul de habitat potențial* sau *multidimensional* al compartimentului respectiv.

2) Suma tuturor domeniilor de activitate pentru un anumit compartiment reprezintă *domeniul* său *de activitate potențial* sau *multidimensional*.

3) Domeniul de habitat multidimensional plus domeniul de activitate multidimensional al unui compartiment formează *nișa sa potențială*.

În acest context, termenul de nișă este efectiv concret și definit riguros pe baza a două componente: domeniul habitatului și domeniul de activitate. Dacă toți termenii de domenii de habitat potențial și de domenii de activitate potențială sînt luați în considerație împreună, nișa unui organism generează un spațiu n-dimensional sau hipervolum*. Hipervolumul poate reprezenta nișa potențială a unui organism sau pentru anumite condiții definite nișa efectivă sau realizată. Nișa efectivă este totdeauna mai mică decît cea potențială.

Wimpenny (1981) consideră că introducerea și utilizarea acestor concepte va permite dezvoltarea unei metodologii practice de analiză și de modelare matematică a creșterii, metabolismului și interacțiunilor din cadrul ecosistemelor microbiene neomogene (structurate).

* În sensul concepției lui Hutchinson (1957), după care nișa ecologică are un caracter multidimensional, incluzînd componente spațiale și trofice, precum și componente („dimensiunile") implicate în interacțiunile cu alți factori de mediu (Botnariuc și Vădineanu, 1982).

# POPULAȚII ȘI COMUNITĂȚI DE MICROORGANISME

**„Populațiile monotipice sînt în mod evident reducționiste, dar nu sînt prin aceasta irelevante pentru ecologia bacteriilor.**
**Chiar din contră!"**

J. S. POINDEXTER
E. R. LEADBETTER

Datorită marii diversități a habitatelor naturale, chiar la scară micrometrică, și în foarte multe cazuri nevoii absolute de interacțiune între microorganisme diferite (ca o condiție pentru colonizarea microhabitatelor), populațiile monospecifice de microorganisme sînt foarte rare în mediile naturale. Ele sînt întîlnite în anumite medii cu condiții extreme și sînt, cel mai frecvent, o creație a omului de laborator.

Deși izolarea microorganismelor în culturi pure are un caracter profund de artificialitate este cert că studiul lor, ca atare, *in vitro*, a furnizat date cu importanță fundamentală pentru înțelegerea activității potențiale a comunităților naturale.

## POPULAȚIA

Populația este formată din indivizii aparținînd aceleiași specii, care trăiesc împreună, în același timp și în același spațiu. Ea poate fi reprezentată, după Brock (1971), de o colonie bacteriană, care ocupă un loc fix în spațiu, dar și de o specie de alge, definită prin morfologia caracteristică, larg răspîndită în fitoplanctonul unui lac.

Pe baza unor date și observații efectuate de Gilbert și Lajtha (1965), Cleaver (1967), luînd în considerație doi factori (multiplicarea și migrarea) care participă direct în modificarea numărului microorganismelor componente, descrie următoarele modalități de existență a populațiilor microbiene în natură:

1) Populații în simplu tranzit, care nu se multiplică (fig. 9 *a*). Situația este caracteristică pentru microorganismele din aer.

2) Populații sedimentate sau „fixate" într-un anumit loc (fig. 9 *b*). Ele au ca echivalent în natură algele sedimentate pe suprafața mîlului dintr-un lac puțin adînc sau marea diversitate de microorganisme, provenite din intestinul gros, stocate tranzitoriu în rectul mamiferelor.

3) Populații în curs de dezintegrare și dispariție ca, de exemplu, microorganismele intestinale, care sînt afectate de tratamentul cu substanțe antibiotice (fig. 9 *c*), și populația statică „închisă" (fig. 9 *d*), corespunzînd unei probe de sol, menținută în stare uscată, în laborator. Acestora li se adaugă alte trei tipuri de populații în care multiplicarea este asociată cu emigrarea sau imigrarea.

4) Populație în tranzit (fig. 9 *e*). Situația corespunde în natură algelor care se multiplică într-o apă curgătoare sau microorganismelor localizate într-un anumit segment al intestinului mamiferelor.

5) Populații în curs de creștere și de sedimentare (fig. 9 *f*), avînd echivalent în natură algele care se înmulțesc atît în coloana de apă, cît și în sedimentul unui lac puțin adînc.

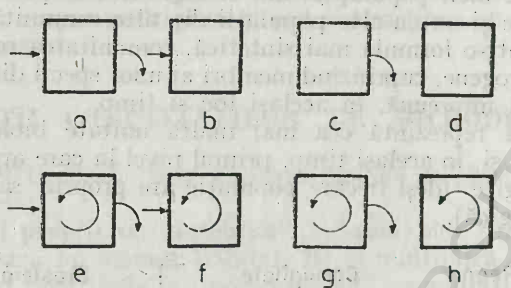



Fig. 9. — Reprezentarea schematică a tipurilor de populații de microorganisme posibile. Săgețile exterioare pătratelor indică migrările celulare (emigrări sau imigrări), iar cele din interiorul lor, diviziunile celulare ce au loc în sistem (după Leaver, 1967).

6) Populații în care multiplicarea este asociată cu emigrarea, în condițiile unei imigrări nesemnificative (fig. 9 *g*). Situația este întîlnită în natură în apele poluate, în care „înfloririle" produse de bacteria *Sphaerotilus natans* sînt asociate cu eliberarea celulelor bacteriene mobile „roitoare".

7) Populația „închisă", care se divide exponențial (fig. 9 *h*), este fără echivalent sau numai foarte rar prezentă în natură. Ea este observată frecvent în culturile discontinue, în laborator.

## COMUNITĂȚILE DE MICROORGANISME

Populațiile de microorganisme care ocupă un anumit habitat inițiază o serie de interacțiuni care au ca rezultat stabilirea unei *comunități* sau *biocenoze* organizate. În acest proces, un rol esențial revine interacțiunilor fiziologice.

Botnariuc și Vădineanu (1982) definesc biocenoza ca „un sistem supraindividual, reprezentînd un nivel de organizare al materiei vii, alcătuit din populații legate teritorial și interdependente funcțional". Interdependența este rezultatul evoluției în comun și adaptării reciproce a populațiilor din biocenoză. Deși specialiștii în domeniul Ecologiei microorganismelor consideră că adaptarea la microorganisme, pe baza analogiei, cu unele date referitoare la plante și animale, este dificilă și arbitrară, cu toate rezervele autorilor lor cele mai multe concepte formulate sînt operațional adecvate.

Woodwell (1967) definește comunitățile de microorganisme ca rezultînd din gruparea unui număr mare de organisme diferite, aflate în relații de interdependență mutuală și consideră că integrarea comunității este determinată de caracteristicile mediului.

Connell și Slatyer (1977) definesc comunitatea ca un set de organisme care sînt prezente împreună și care își influențează unele celorlalte, în mod semnificativ, distribuția și abundența. Aceste interacțiuni fac din comunitate o unitate integrată.

Swift (1984) definește comunitatea de microorganisme ca o grupare de specii care locuiesc un „volum de resurse" ca, de exemplu, o frunză sau o baltă, în așa fel încît populațiile din comunitatea respectivă tind să interacționeze între ele și *nu* cu alte populații din alte comunități.

În sfîrșit, într-o formulă mai sintetică, comunitatea reprezintă un grup de populații heterogene, cuprinzînd membri ai unor specii diferite care trăiesc și interacționează împreună, în același loc și timp.

Comunitatea reprezintă cea mai înaltă unitate biologică în ierarhia ecologică (fig. 10) și, în același timp, primul nivel la care apare însușirea productivității biologice (deși fiecare populație are propria sa însușire de productivitate biologică).

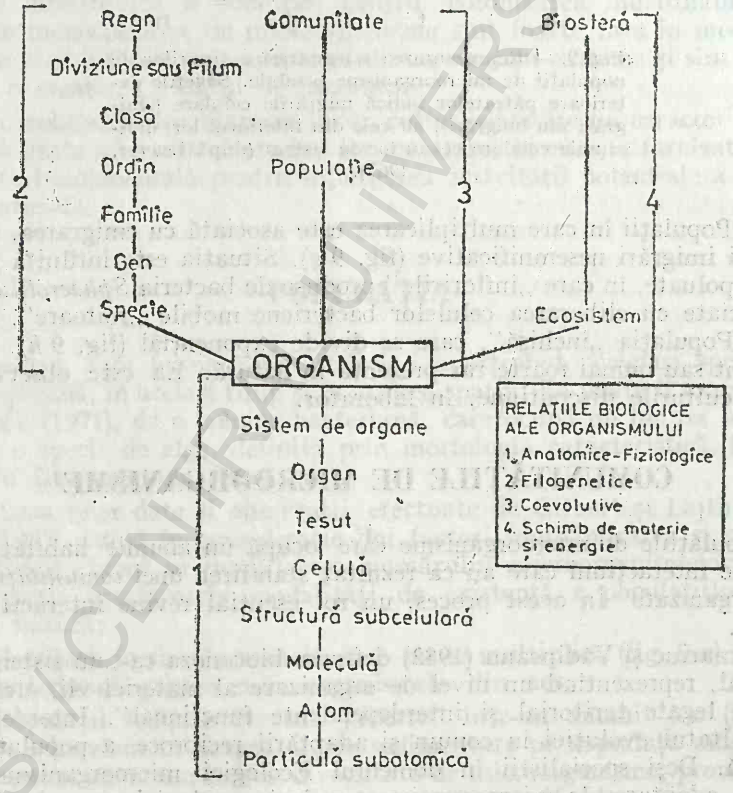



Fig. 10. — Relațiile biologice ale organismului, evidențiind poziția populațiilor și a comunităților de organisme, precum și a ecosistemului (după Mac Mahon și colab., 1978).

Comunitățile de microorganisme reprezintă sisteme biologice complexe, foarte adecvate pentru studiile de organizare și dinamică ale populațiilor. Ele au avantajul că se dezvoltă rapid, ocupă volum mic, sînt mai puțin com-

plexe decît biocenozele organismelor mai evoluate și mai ușor de studiat. Rezultatele experimentale nu pot fi extrapolate la populațiile altor organisme decît cu o prudență maximă.

Spre deosebire de alte organisme, granițele comunităților de microorganisme sînt greu sau uneori chiar imposibil de delimitat, deoarece ele se suprapun de foarte multe ori: microalgele de țărm se întîlnesc și în comunitățile din larg sau în coloana de apă. De asemenea, unele microorganisme din sol pot fi întîlnite, se pot multiplica și pot interacționa în apele de rîu, de lac sau chiar de mare.

## COMPONENȚII COMUNITĂȚILOR DE MICROORGANISME

Alexander (1971) descrie două categorii majore de „locuitori" ai comunităților microbiene:

A) **Locuitorii proprii sau autohtoni** (indigeni) sînt caracteristici comunității care populează un anumit habitat. Ei se multiplică în diferite etape ale existenței lor și contribuie la metabolismul comunității. Caracterul de autohton este, în general, greu de determinat din cauza lipsei unor criterii universal valabile și a caracterului ubicvitar al multor microorganisme.

Între criteriile utile sînt de menționat:

1) prezența constantă și în număr mare de organisme individuale;

2) posibilitatea de izolare repetată și constantă din habitatul respectiv;

3) capacitatea de a utiliza și în cultură pură nutrienți caracteristic mediului natural studiat;

4) capacitatea de a suporta condițiile mediului respectiv.

B) **Locuitorii alohtoni sau invadatori** sînt reprezentați de specii care aparțin altor medii și care au ajuns accidental într-un anumit habitat, în care se mențin temporar, fie ca forme vegetative (în cazul în care nu sînt distruse), fie ca spori. Eliminarea lor este determinată de incapacitatea de a competiționa cu mediul biologic (respectiv cu microorganismele autohtone, mai numeroase și mai bine adaptate) sau cu factorii abiotici. Un exemplu caracteristic este cel al microorganismelor patogene ajunse în sol sau al celor din alimente care sînt neutralizate în sistemul digestiv.

**Asociațiile interspecifice** sînt reprezentate de microorganismele care apar frecvent împreună sau care se dezvoltă relativ constant unele în apropierea celorlalte. Ele includ microorganisme ce au capacitatea de a crește și de a ocupa habitate cu proprietăți fizico-chimice similare. Pot prezenta grade diferite de interacțiune, unilateral sau bilateral benefice.

Termenul de *specie caracteristică*, folosit de unii specialiști definește specia de microorganism prezentă în număr mare și, în general, în exclusivitate într-un anumit habitat, respectiv într-o anumită comunitate. În cazurile în care este întîlnită și în alte habitate este întotdeauna în număr foarte mic și ecologic nesemnificativ.

Studiul evoluției în timp a comunităților de microorganisme a arătat că, de cele mai multe ori, stabilitatea lor este condiționată de succesiunea mai multor populații, în timp și în spațiu. În unele cazuri însă, chiar două populații distincte pot forma de la început o structură stabilă a comunității. Studiile experimentale, efectuate cu ajutorul bacteriilor, în chemostat, simulînd condițiile din anumite ecosisteme acvatice, au arătat că stabilitatea

apare cel mai adesea cînd populațiile care interacționează cooperează pentru a asigura cea mai bună exploatare a sistemului.

*Speciile dominante* sînt cele prezente cu numărul cel mai mare de organisme individuale sau cu cea mai mare abundență de hife într-o comunitate.

*Speciile codominante* corespund situației în care două sau mai multe specii predomină numeric în comunitatea studiată.

Comunitățile de microorganisme, ca grupuri de populații interdependente, sînt mai bine adaptate pentru creștere decît o specie unică. Studiile experimentale efectuate cu populații mixte, în condiții de mediu variabile sau simulînd situații caracteristice unor ecosisteme, au confirmat, fără echivoc, acest punct de vedere. Astfel, este cert că în unele cazuri, capacitatea de a utiliza o sursă de C, energie sau respectiv de a transforma un anumit compus depinde de un atac metabolic concertat al speciilor componente ale comunității.

Slater și Godwin (1980) citează cazurile frecvente, în care nici un microorganism individual nu poate singur să utilizeze ca sursă de C substanțe cum sînt alchilbenzensulfonații sau nu pot să le degradeze atît de înaintat cum o fac culturile mixte.

Un exemplu și mai riguros este furnizat de Daugton și Hsteh (1977), care au demonstrat că, în asociere, bacteriile *Pseudomonas stutzerii* și *P. aeruginosa* utilizează ca sursă de C și energie produsul *Parathion*, în timp ce separat nu. În acest proces, *P. stutzerii* hidrolizează compusul la doi produși: dietiltiofosfat și p-nitrofenol, pe care nu-i poate folosi ca sursă de C. În schimb, *P. aeruginosa*, care nu acționează direct asupra produsului normal, se dezvoltă pe p-nitrofenol. În cazul asocierii (al comunității complete), produșii de liză și/sau metaboliții proveniți de la *P. aeruginosa* sînt folosiți ca sursă de C de *P. stutzerii*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# SUCCESIUNEA ECOLOGICĂ

Monitorizarea populațiilor de microorganisme care ocupă nișele dintr-un ecosistem demonstrează, cu evidență, datorită ritmului lor de multiplicare foarte rapidă, că structura comunității evoluează în timp: unele populații sînt înlocuite cu altele mai bine adaptate să îndeplinească un anumit rol funcțional, respectiv să ocupe o nișă ecologică.

Fenomenul este cunoscut sub denumirea de *succesiune ecologică* și implică o serie de modificări în compoziția speciilor și în abundența lor relativă într-o comunitate, ca răspuns la modificările habitatului.

Succesiunea este inițiată de una sau de mai multe specii (populații) de microorganisme, care în timp sînt înlocuite de altele pînă cînd se realizează o comunitate de populații relativ stabile, un echilibru între biotic și abiotic. Sistemul terminal, stabilizat, este numit *climax*. Ansamblul etapelor succesiunii de comunități dintr-un habitat, care duc la o asociație particulară de climax, este denumit *serie* (engl. „sere", derivat regresiv de la series). Conceptul de serie, aplicat inițial comunităților vegetale, corespunde unor stadii de dezvoltare (faze succesionale sau seriale), clasificate în raport cu habitatul sau cu factorii de influență majoră. Corespunzător au fost create denumiri ca litoserie, hidroserie, xeroserie etc.

În unele succesiuni se pot observa stadii distincte. Unele grupuri de microorganisme dominante într-o anumită etapă sînt relativ rare sau chiar absente în cea următoare. Cel mai adesea însă, tranziția în procesele de succesiune a speciilor individuale nu se realizează brusc: atît dispariția speciilor „vechi", cît și apariția celor „noi" se realizează lent, astfel încît două comunități succesive pot avea populații comune. Aceasta face ca o anumită etapă a succesiunii să nu aibă un început sau un sfîrșit brusc, ci să prezinte, uneori, numai modificări ale densității sau naturii speciilor componente, dar cu o tendință netă de înlocuire (Alexander, 1971).

## CONCEPTUL DE MICROORGANISME-PIONIER

În sens strict, *microorganismele-pionier* („Pioneer microorganisms") proliferează primele într-o anumită circumstanță sau într-un anumit mediu necolonizat (lipsit de viață). Într-o accepțiune mai largă, ele sînt reprezentate de prima specie sau prima comunitate de microorganisme care colonizează sau recolonizează un teritoriu nelocuit sau perturbat, inițiind, prin aceasta, o nouă succesiune ecologică (Lincoln, Boxshall și Clark, 1984). În

acest context, caracterul de microorganism-pionier nu este limitat la specia sau speciile care ocupă primele un habitat virgin (nelocuit), ci este extins și la cele care ocupă un habitat nesteril, dar lipsit de microorganismele respective. În acord cu acest punct de vedere, pot fi considerate ca microorganisme-pionier speciile de alge care colonizează un bazin acvatic din care anterior au lipsit sau microorganismele care colonizează un material vegetal expus descompunerii într-un sol umed. Pe măsură ce se dezvoltă, ele formează o *comunitate-pionier*.

Natura microorganismelor-pionier este diferită în funcție de particularitățile habitatului ce trebuie colonizat, fiind limitată la specii capabile să crească în prezența nutrienților existenți în mediul respectiv. În habitatele lipsite de C organic, în prezența nutrienților anorganici și a luminii se dezvoltă cu precădere cianobacteriile, bacteriile fotosintetizante și algele. În regiunile cu cantități mici de substanțe organice, lipsite de factori de creștere, se dezvoltă bacteriile heterotrofe, nepretențioase, iar în cele bogate în substanțe organice, care includ și factori de creștere, se dezvoltă de la început microorganismele heterotrofe „pretențioase".

Succesul instalării și al colonizării ca microorganisme-pionier este condiționat de cîteva proprietăți esențiale:

1) Posibilitatea de a fi dispersate activ sau pasiv, de a se stabili și localiza într-un anumit loc, de a germina prompt în cazul sporilor sau al altor forme de rezistență) și de a iniția creșterea într-un mediu care poate fi adesea ostil (frecvent, acest caracter este determinat de cantitatea extrem de mică de nutrienți, însă suficientă pentru a asigura dezvoltarea comunității-pionier).

2) Să aibă o serie de caractere variabile și o capacitate de adaptabilitate la mediul care trebuie colonizat.

3) Formele lor vegetative să fie tolerante la condiții de mediu adverse, determinate de pH, temperatură, presiune osmotică sau hidrostatică, umiditate sau uscăciune, concentrația $O_2$ și să suporte fluctuațiile diurne sau sezoniere, uneori foarte mari, ale unor factori din mediu.

4) Să poată menține temporar colonizarea mediului respectiv cînd componenții săi modifică habitatul într-un mod în care împiedică inițierea unor succesiuni (Atlas și Bartha, 1987).

În mod normal, pe măsură ce se multiplică într-un habitat, microorganismele comunității-pionier utilizează selectiv anumite resurse din mediu. Ele induc modificări ale acestuia, îl fac din punct de vedere biochimic mai complex, diversificînd numărul nișelor și producînd constituenți celulari și produși extracelulari.

Treptat, condițiile modificate nu mai sînt adecvate pentru microorganismele-pionier. Ele pot rezista numai o scurtă perioadă de timp fără a fi eliminate. Uneori însă, pot supraviețui perioade îndelungate, dacă pot competiționa cu microorganismele ce se instalează în succesiune și cu mediul modificat.

În general însă, microorganismele-pionier au o existență tranzitorie: ele se multiplică și cresc ca densitate pînă cînd un factor fizic, chimic sau biologic face mediul necorespunzător pentru existența lor. Cel mai frecvent intervin: modificările de pH, acumularea metaboliților toxici, epuizarea nutrienților, factorii limitanți biologici (competiție, parazitism, prădare) sau, în cazul agenților patogeni, răspunsul de apărare al gazdei. În aceste condiții,

numărul lor scade progresiv și sînt lent și irevocabil eliminate, fiind înlocuite de alte microorganisme aparținînd succesiunii pe care au inițiat-o.

*Funcția de excludere*, a cărei existență în natură este considerată ca relativ frecventă, reprezintă capacitatea unei specii -pionier de a împiedica stabilirea altei specii diferite. Evidențiată în studiile de ecologia microorganismelor patogene, această funcție, descrisă sub denumirea de *colonizare preemptivă* („Pre-emptive colonization"), reflectă un proces de interferență care favorizează „primul ocupant" al habitatului respectiv. Ea are o importanță deosebită dacă microorganismul exclus este un patogen. Fenomenul a fost evidențiat în cazul animalelor „germ-free" (axenice), care fac infecții rapide și cu evoluție severă dacă sînt infectate cu bacterii patogene. Colonizate inițial cu bacterii saprofite inofensive, ele rezistă la infecția cu patogeni.

Un fenomen similar este citat de Alexander (1971), bazat pe observațiile lui Eichenwald și colab. (1965), într-un mediu spitalicesc. Copii nounăscuți (mai mici de 24 de ore), sînt infectați cu *Staphylococcus aureus* coagulază-negativi de la personalul de îngrijire. Copiii din același serviciu care erau purtători nazali de *S. aureus* coagulază-pozitivi nu s-au infectat.

Datorită fenomenului de preempțiune, Marples (1965) a demonstrat că prin colonizarea artificială cu stafilococi nepatogeni există posibilitatea excluderii tulpinilor patogene.

Natura fenomenului de excludere nu este cunoscută. Se presupune că microorganismele-pionier desfășoară o serie de activități (ocuparea fizică a nișei, utilizarea nutrienților, modificarea habitatului, producerea de toxine), care fac imposibilă colonizarea speciei excluse.

## CLASIFICAREA SUCCESIUNILOR

În funcție de modul de producere au fost descrise două tipuri:

1) **Succesiunea primară** are ca punct de plecare colonizarea cu microorganisme a unei regiuni anterior sterile. Este tipică în cazul sistemului digestiv al mamiferelor, care este steril la naștere, dar colonizat de microorganisme-pionier la puțin timp în viața extrauterină, care inițiază o succesiune caracteristică în perioadele următoare.

2) **Succesiunea secundară** apare într-un habitat colonizat anterior, avînd ca punct de plecare o stare în care alte microorganisme sînt încă prezente. Un exemplu tipic este cel al modificărilor impuse de introducerea în sol a gunoiului de grajd sau a altor reziduuri organice. În acest cadru, succesiunea secundară apare ca un eveniment ce perturbă cursul succesiunii primare.

În funcție de modul de producere au fost descrise două tipuri de succesiuni:

1) **Succesiunea autogenă** este determinată de activitatea și interrelațiile microorganismelor care colonizează un anumit habitat și de interacțiunile lor cu mediul ambiant. Ea corespunde situației în care microorganismele ce colonizează un anumit habitat induc modificări mediului respectiv, care-l fac mai potrivit pentru alte categorii de microorganisme. În felul acesta, microorganismele care au determinat modificarea sînt înlocuite de una sau de mai multe specii mai bine adaptate la noile condiții ale habitatului modificat.

Situația frecvent întîlnită poate fi descrisă ca tipică în cazul microorganismelor-pionier. Ele colonizează un anumit mediu și determină modificări prin care acesta devine progresiv mai adecvat microorganismelor ce le succed, în timp ce „pionierii" pierd din avantajul care le-a asigurat calitatea de colonizatori primari și tind să dispară.

Natura modificărilor este variabilă. Ele pot include îndepărtarea nutrienților, modificări de pH, producerea de autoinhibitori, autotoxine, alte tipuri de metaboliți toxici (Alexander, 1971).

2) **Succesiunea alogenă** corespunde situației în care forța motrice a înlocuirii unei anumite comunități cu alta este reprezentată de modificările proprietăților fizico-chimice, importante din punct de vedere ecologic, ale habitatului, induse de factori abiotici. În cazul agenților fito- sau zoopatogeni, succesiunea este determinată de modificări ale organismelor vegetale sau animale pe care sau în care aceștia sînt localizați.

**Periodicitatea.** Unele modificări ale populațiilor de microorganisme sînt periodice sau ciclice, fiind determinate de variații cantitative ale unor factori de mediu (intensitatea iluminării, modificările temperaturii sau ale concentrației nutrienților asociate cu anotimpul etc.).

Park (1972) a evidențiat dificultățile de apreciere a periodicității în mediile acvatice cu apă dulce și necesitatea studiilor de lungă durată pentru diferențierea lor de modificările succesionale (progresive și normal ireversibile). Interpretarea este îngreuiată de faptul că există microorganisme a căror prezență într-un mediu este constantă, în timp ce activitatea lor este periodică.

Pentru înțelegerea acestui fenomen, Park (1972) propune următoarele criterii definitorii:

1) Noțiunea de prezență *constantă* se referă la un microorganism prezent sau activ într-un anumit situs sau pe un anumit substrat în toate anotimpurile.

2) *Periodicitatea* este caracteristică unor specii a căror prezență sau activitate este asociată cu oarecare regularitate cu un fenomen sezonier care ține de mediu (variații de temperatură, căderea frunzelor etc.).

3) Prezența sau activitatea *sporadică* are un caracter predominant de neregularitate probabil determinat de modificări aleatorii ale mediului ca, de exemplu, direcția vîntului, prezența precipitațiilor etc.

## SUCCESIUNILE ECOLOGICE ÎN NATURĂ

Fenomenele de succesiune a microorganismelor au fost descrise într-o serie de medii dintre cele mai diferite (sistemul digestiv al mamiferelor nounăscute, rumenul rumegătoarelor, izvoare, lacuri, ape reziduale, compost, litiera de foioase și de conifere, sol etc.).

Unele au fost descrise înainte de cristalizarea conceptelor fundamentale ale Ecologiei microorganismelor. Între acestea, un caz tipic este reprezentat de succesiunea inițiată de bacteriile și fungii proteolitici, care produc prin activitatea lor metabolică $NH_3$. Acesta este preluat de bacteriile nitrificatoare (nitrit- și nitrat-bacterii), care produc nitrat capabil să inducă „înflorirea" algelor.

După cum remarcă Atlas și Bartha (1987), succesiunile pot fi autotrofe sau heterotrofe.

## Succesiunea autotrofă

Succesiunea microorganismelor autotrofe are o importanță ecologică deosebită, deoarece asigură colonizarea mediilor naturale nefertile, lipsite de materie organică. Ea este caracteristică comunităților-pionier tinere, care pot coloniza rocile vulcanice nude, recent expuse la suprafața solului.

Inițierea succesiunii condiționată de prezența energiei solare este realizată de microorganismele fototrofe (cianobacterii și unele alge), cu exigențe nutriționale minime și o mare toleranță la condiții de mediu nefavorabile. Capacitatea unor cianobacterii de a fixa azotul molecular atmosferic este un factor favorizant major. În fazele inițiale ale succesiunilor autotrofe, activitatea fotosintetizantă (P) depășește viteza de respirație (R) a comunității de microorganisme. Raportul fotosinteză/respirație (P/R) este mai mare decît 1, ceea ce face ca în mediile respective să se acumuleze biomasă microbiană. Pe măsură ce succesiunea evoluează spre stadiul de comunitate stabilă, raportul P/R se apropie de 1. Un rol important în succesiune revine asocierii simbiotice cianobacterii/fungi sau alge/fungi sub forma lichenilor.

## Succesiunea heterotrofă

Are drept caracteristică scăderea în timp a fluxului de energie prin sistem. Dacă aportul de materie organică de la exterior este insuficient, comunitatea de microorganisme își disipează propria energie chimică stocată și succesiunea heterotrofă este, în consecință, temporară: cînd energia disponibilă în sistem este epuizată comunitatea de microorganisme este expusă dispariției.

Succesiunile heterotrofe temporare sînt caracteristice comunităților de microorganisme implicate în procese de descompunere. Comunitățile de microorganisme implicate în degradarea unei buturugi dispar în momentul în care aceasta este complet descompusă. În cazurile în care comunitatea heterotrofă este aprovizionată continuu cu materie organică de la exterior, succesiunea evoluează spre o comunitate stabilă, respectiv spre stadiul de comunitate-climax. Așa este cazul microbiotei ruminale a rumegătoarelor sau al celei intestinale de la celelalte mamifere, care persistă atît cît timp aportul de hrană este regulat. În momentul în care animalele încetează să se hrănească apar perturbări în structura și densitatea microbiotei, care evoluează rapid spre dispariție.

După Atlas și Bartha (1987), microorganismele-pionier ale unei succesiuni heterotrofe trebuie să dispună de o activitate metabolică ridicată și de viteze mari de creștere pentru a se putea opune invadatorilor secundari.

### Succesiunea microorganismelor pe particulele detritice în mediile acvatice

Detritusul vegetal proaspăt prezent sub formă de țesuturi vegetale (rădăcini, tulpini, frunze) mărunțite și amestecate cu cantități mici de resturi de altă natură sînt, de regulă, asociate cu comunități complexe de microorganisme.

Pentru a studia evoluția succesiunilor la nivelul lor, Fenchel și Jorgensen (1977) au urmărit, prin microscopie electronică în scanning, apariția diferitelor categorii de microorganisme pe suprafața particulelor detritice sterilizate, submerse în apa de mare sau în apă dulce și inoculate cu o cantitate mică de detritus natural. Bacteriile apar primele, după 6—8 ore, ca microorganisme-pionier. Ele se multiplică, atingînd densitatea maximă după 15—150 de ore, după care scad numeric pînă la o limită de stabilitate după 200 de ore. După aproximativ 20 de ore apar o serie de zooflagelate mici, care ating densitatea maximă după 100—200 de ore. Ciliatele le urmează după aproximativ 100 de ore de la debutul experimentului și ating densitatea maximă după 200—300 ore. Tardiv, apar și alte grupuri de microorganisme (în special diatomee și rizopode). Final, această succesiune duce la apariția unei comunități de microorganisme foarte asemănătoare celei prezente pe detritusul natural, în care protozoarele acționează ca prădători primari, utilizînd ca hrană celulele bacteriene. Este probabil că temperatura și alți factori de mediu afectează evoluția în timp a succesiunii.

Esențial este faptul că prin această acțiune, pornind de la descompunerea unor polimeri săraci în N, proprii țesuturilor vegetale, se ajunge la înlocuirea lor cu biomasa microbiană (protozoare, bacterii etc.) bogată în N, importantă pentru nutriția nevertebratelor și vertebratelor detritivore.

Colonizarea suprafețelor solide submerse în apele marine a fost studiată și de Roszak și Calwell (1987). Ei au demonstrat că primii colonizatori sînt reprezentați de minibacterii, respectiv de formele adaptate să supraviețuiască la marea varietate de factori fizici și chimici departe de condițiile normale de creștere. Ele ajung la suprafața obiectelor submerse într-o fază de latență, în așa fel încît intrarea în diviziune are loc după o fază, uneori prelungită, de lag. Ulterior, sînt înlocuite de bacterii normale, care cresc activ, probabil proprii lor descendenți care declanșează intrarea în acțiune a succesiunii.

## Succesiunile consecutive poluării organice a rîurilor

Acestea au fost studiate de Hynes (1960), care a descris modificările fizice, chimice și biologice produse de deversarea unui efluent cu mare încărcătură organică (fig. 374). Aceste efecte se atenuează progresiv, datorită fenomenelor de autoepurare și de diluție, în așa fel încît la o anumită distanță în aval de situsul de impurificare atît condițiile fizico-chimice, cît și cele biologice revin la normal.

Kendrick și Burges (1962) au studiat succesiunea microfungilor pe suprafața acelor de pin din litiera pădurilor (fig. 11). Este probabil că, în paralel, există și o succesiune a populațiilor bacteriene, care interacționează cu cele fungice și influențează evoluția acestora.

## Succesiuni asociate cu formarea solurilor structurate

Numeroase date certe demonstrează implicarea directă a diferite grupuri de microorganisme în formarea solurilor, pornind de la unele medii infertile (roci dezgolite, subsoluri erodate, suprafețe deșertice), cu concentrații scăzute de nutrienți anorganici, în absența aproape completă a substanțelor organice și, adesea, în prezența unor condiții ostile de mediu (absența umidității, condiții extreme de temperatură etc.).

Campbell (1977) descrie etapele acestui proces complex și îndelungat, după cum urmează:

Microorganismele-pionier sînt reprezentate de cianobacterii și de unele alge tolerante. Ele includ specii de: *Gloeocapsa, Glococystis, Nostoc (N. ellipsosporum, N. muscorum), Scytonema* (în special, *S. hafmanii*), *Palmogloca protuberans, Porphyrosiphon notarisii, P. cinnamomens, Schizothrix calcicola, Zygogomium ericetorum* etc.). Prezența capacității de fixare a $N_2$ de către unele cianobacterii, precum și a capsulei și a învelișului extern mucilaginos, la majoritatea microorganismelor citate, reprezintă avantaje majore din punct de vedere ecologic.

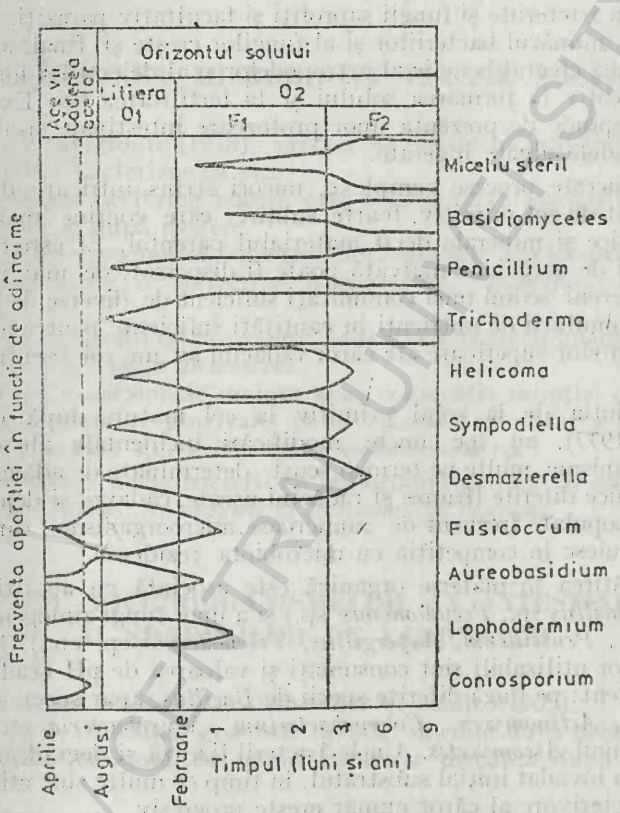



Fig. 11. — Succesiunea populațiilor fungice care colonizează acele vii de *Pinus silvestris* în cursul degradării lor în litieră. Grosimea pe verticală a structurilor indică frecvența de apariție a fungilor în regiunile studiate ale acelor de pin. Cu cît sînt mai groase, cu atît frecvența este mai mare (după Kendrick și Burges, 1962).

Multiplicarea lor are drept consecință acumularea de materie organică la care se adaugă particule de praf, formînd o peliculă inițială ce este stabilizată, în special, de speciile care produc polizaharide extracelulare.



BCU IAȘI CENTRUL UNIVERSITY LIBRARY

Se adaugă o serie de acțiuni secundare, dar avînd un rol major în formarea solului primitiv. Ele includ:

1) infiltrarea cu apă și reținerea ei în crusta algală, care ulterior devine propice germinării semințelor plantelor superioare;

2) acțiunea bacteriilor, a fungilor și a algelor care dizolvă mineralele din stratul de rocă, grăbind modificările chimice;

3) accentuarea erodării fizice a rocilor sub acțiunea microorganismelor dezvoltate în fisuri și a alternanței dintre expansiunile și contracțiile alternative ale apei expuse la variații de îngheț și dezgheț, umiditate mare și uscăciune;

4) îmbogățirea solului primitiv în substanțe organice și anorganice derivate din exsudatele celulare și din resturile celulelor moarte, care devin nutrienți pentru bacteriile și fungii saprofiți și facultativ paraziți. Pe măsură ce apar lichenii, numărul bacteriilor și al fungilor crește și, final, apar protozoarele. Se adaugă efectul benefic al artropodelor și al dejecțiilor lor, care contribuie semnificativ la formarea solului și la fertilitatea lui. Existența unora dintre ele depinde de prezența unor protozoare intestinale specializate, care consumă celulele algale ingerate.

Toate aceste procese complexe, uneori strîns intricate, duc la formarea unui strat de sol primitiv, foarte subțire, care conține mai multe substanțe organice și minerale decît materialul parental. El este foarte instabil și în condiții de uscăciune marcată poate fi dispersat, de mai multe ori, înainte de a deveni sediul unei comunități suficient de diverse de microorganisme și al acumulării de nutrienți în cantități suficiente pentru a asigura dezvoltarea plantelor superioare ale căror rădăcini au un rol esențial în stabilizarea lui.

În evoluția de la solul primitiv la cel matur, după cum remarcă Campbell (1977), au loc unele modificări incidentale ale comunităților de microorganisme, multe pe termen scurt, determinate de adăugarea de substanțe organice diferite (frunze și rădăcini uscate, cadavre și dejecții de artropode etc.), populate frecvent de numeroase microorganisme, care, în general, nu supraviețuiesc în competiția cu microbiota rezidentă.

Îmbogățirea în materie organică este asociată cu apariția bacteriilor saprofite (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) și a unor fungi zimogeni (*Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* sp. etc.). Pe măsură ce nutrienții ușor utilizabili sînt consumați și valoarea de pH scade, microbiota se modifică lent: pe lîngă diferite specii de *Bacillus*, apar specii de *Cytophaga*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Myxobacteria* etc., precum și fungi din grupul *Ascomycetes*. Unele bacterii lizează și degradează hifele fungilor, care au invadat inițial substratul, în timp ce multe sînt utilizate de protozoarele bacterivore al căror număr crește progresiv.

Diversitatea bacteriilor și a fungilor scade pe măsură ce materialele organice sînt degradate, în așa fel încît stadiul final al succesiunii este marcat de invazia substratului, în mare măsură epuizat, de microorganismele autohtone. Relațiile de competiție predominante în fazele anterioare sînt înlocuite de cele de comensalism și/sau de mutualism, datorită unor microorganisme diferite, care dispun de echipamente enzimatice complementare.

Întreaga gamă de modificări enumerate nu are un caracter omogen deoarece diferitele tipuri de materie organică sînt colonizate de populații diferite de microorganisme. În consecință, în diferitele regiuni ale solului se dezvoltă

un mozaïc de colonizări, populate de colonizatori diferiți, în faze diferite de activitate (Campbell, 1977).

Final, activitatea microorganismelor este influențată de intervenția artropodelor și a rîmelor, cu un rol complex în:

1) mărunțirea resturilor organice în fragmente mici, oferind o suprafață mare de atac microorganismelor;

2) înglobarea acestor resturi ca hrană și trecerea lor prin intestin modifică materia organică originară sub acțiunea bacteriilor și a protozoarelor intestinale, care descompun substanțele recalcitrante la digestie;

3) îmbogățirea materiei organice în acid uric, substanțe mucilaginoase și favorizarea dezvoltării microorganismelor, de cîteva ori mai intensă comparativ cu materia nedigerată.

## SUCCESIUNEA MICROBIOTEI BUCALE UMANE

Gibbons și van Houte (1978), precum și Nikiforuk (1985) descriu succesiunea microbiotei bacteriene la om.

Inițial sterilă, cavitatea bucală este colonizată de bacteriile-pionier din mediu la scurt timp după naștere.

În acest stadiu predomină bacteriile microaerofile sau facultativ anaerobe ca: *Streptococcus mitior, S. salivarius, Neisseria* sp., *Staphylococcus* sp., *Lactobacillus* sp.

La cîteva săptămîni de la naștere apar unele bacterii anaerobe ca *Fusobacterium* sp. și *Veillonella alcalescens.*

Modificările succesionale majore apar consecutiv erupției dinților, care creează situsuri retentive gingivale, ce favorizează colonizarea lor de forme anaerobe ca *Bacteroides* sp., *Vibrio* sp., *Fusobacterium* sp.

Final se adaugă unele bacterii cu importanță majoră în ecologia bucală ca *Streptococcus mutans, S. sanguis* și *Actinomyces viscosus.*

## SUCCESIUNEA MICROORGANISMELOR ÎN INTESTINUL GROS AL ȘOARECILOR DE LABORATOR

Aceasta a fost studiată de Schaedler și colab. (1965).

Inițial steril, intestinul gros este invadat imediat după naștere de *Flavobacterium* sp., care se înmulțesc rapid pentru a dispărea după aproximativ 8 zile.

Enterococii, care se instalează din primele zile, se multiplică atingînd densitatea maximă după 12 zile, pentru a scădea la un nivel stabil, menținut și la finele observației (după 30 de zile).

Coliformii, care apar în număr mic din primele zile, cresc dramatic între 10 și 14 zile, pentru a diminua la un nivel care, de asemenea, se menține stabil.

*Lactobacillus* sp. și *Streptococcus* sp. cresc masiv și se mențin ca atare din zilele 8—10 pînă la sfîrșitul observației.

În sfîrșit, tulpinile de *Bacteroides* și formele înrudite apar după aproximativ 18 zile postpartum, pentru a deveni comunitatea dominantă în stadiul de

climax (fig. 12). Corespunzător numeroaselor nișe prezente în sistemul gastro-intestinal, acestor populații de bază li se adaugă alte grupuri de microorganisme, care proliferează lent, ajungînd, uneori, la densități mari, după care scad sau chiar sînt eliminate.

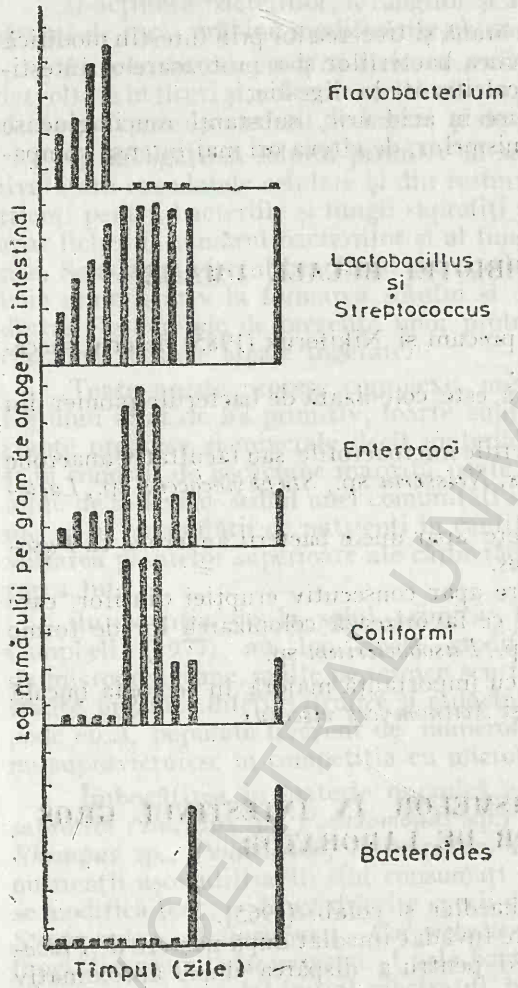



Fig. 12. — Succesiunea populațiilor de microorganisme în intestinul gros al șoarecelui după naștere. Determinările au fost efectuate la interval de două zile, pînă în ziua a 18-a, apoi la 30 de zile postpartum. Datele sînt prezentate ca logaritmul numărului de bacterii per gram de omogenat intestinal (după Schaedler și colab., 1965).

Natura și densitatea diferitelor populații de microorganisme intestinale sînt reglate de procese multifactoriale, unele exercitate de gazdă, altele de microorganisme și, în sfîrșit, altele de mediu (în special de dietă).

Succesiuni similare au fost observate și la om, la care stadiul de climax este atins în momentul înțărcării.

## SUCCESIUNEA MICROORGANISMELOR ÎN RUMEN

Lengemann și Allen (1955, citați de Brock, 1966) au urmărit evoluția ecosistemului ruminal, demonstrînd că stadiul de echilibru atins la un moment dat este în funcție atît de populațiile de microorganisme dominante, cît și de mediu.

Bacteriile prezente în număr mare încă din prima lună postpartum nu asigură o eficiență deosebită în procesul de degradare a celulozei. În luna următoare, pe măsură ce crește numărul protozoarelor, capacitatea de digestie a celulozei crește semnificativ și odată cu aceasta apar modificări importante în proporția diferiților acizi organici (tabelul nr. 2).

După aproximativ un an, în cadrul unui ecosistem echilibrat, digestibilitatea celulozei este maximă. Această stare se menține practic pentru tot restul vieții animalului. După Brock (1974), ecosistemul ruminal ilustrează un caz în care microbiota colonizează un mediu inițial steril, se dezvoltă, dobîndește un stadiu de stabilitate și reușește să controleze condițiile de mediu (în

*Tabelul nr. 2*

**Dezvoltarea ecosistemului ruminal ilustrată prin modificările biologice și chimice**
(după Lengemann și Allen, 1955)

| Virsta animalului | Numărul total al bacteriilor ($\times 10^9$/g)* | Numărul protozoarelor ($\times 10^3$/ml) | Producerea de gaze de la celuloză (ml) | Conținutul mediu (m moli/l) în acizi organici | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Succinic–lactic | Formic | Acetic | Propionic | Butiric | Total |
| O lună | 46 | 0 | 0,8 | 56 | 5,5 | 48,8 | 25,2 | 16,2 | 152 |
| Două luni | 28,5 | 137 | 4,2 | 6,6 | 1,5 | 69,7 | 32,4 | 18,6 | 129 |
| Trei luni | 38 | 659 | 3,8 | 6,1 | 1,5 | 75,0 | 26,8 | 17,9 | 127 |
| Șase luni | 44 | 738 | 5,4 | 13,5 | 2,5 | 73,3 | 18,7 | 22,4 | 130 |
| Un an | 53 | 843 | 7,3 | 6,8 | 1,2 | 67,7 | 16,3 | 18,0 | 110 |
| Adult (peste doi ani) | 66 | 477 | 9,4 | 5,2 | 1,3 | 63,0 | 18,1 | 14,5 | 102 |

* prin numărătoare directă



BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

special, condițiile de pH și $E_h$). Odată stabilizată, microbiota ruminală asigură activitatea normală de digestie a țesuturilor vegetale și continuitatea acestei activități, deși la fiecare administrare de hrană se adaugă un aport nou de nutrienți și un set nou de microorganisme diferite.

## STADIUL DE CLIMAX

Conceptul de succesiune implică ideea de modificare treptată a comunităților de microorganisme spre o ultimă fază succesională numită de *climax* (Clements, 1916) sau de *maturitate* (Margalef, 1962). Stadiul de climax (gr. „klimax" = scară) este definit ca fiind caracteristic unei comunități relativ stabile, în echilibru cu condițiile de mediu și care reprezintă, după unii autori, stadiul terminal al unei succesiuni ecologice.

În realitate, o comunitate de microorganisme în stadiul de *climax* nu este perfect stabilă, ci prezintă un grad redus de instabilitate. Ea nu este consecința unui set de circumstanțe statice, ci reflectă o stare dinamică și o stabilitate mai mare decît cea a stadiului premergător.

În mediile terestre, un sistem aflat în stadiul de climax modifică mediul în așa fel încît este capabil să se mențină *per se* chiar în prezența unor perturbări importante provenite de la exterior. În ecosistemele respective (ca, de exemplu, cele de pădure) organismele mari, cu structură complexă, au evoluat pentru a competiționa eficient cu mediul natural foarte variabil.

Situația este fundamental diferită de cazul comunităților de microorganisme la care conceptul de climax este mai greu de aplicat (Alexander, 1971; Brock, 1974). În mod evident există și în cazul comunităților de microorganisme situații în care modificările succesionale au un caracter regulat, în sensul că anumite populații modifică mediul într-un anumit mod, care permite dezvoltarea unor populații noi, diferite. Așa este cazul microorganismelor facultativ anaerobe, care epuizează oxigenul din mediul în care se dezvoltă, creînd condiții de anaerobioză și asigurînd succesiunea (autogenă) microorganismelor obligat anaerobe. Cel mai adesea însă, anumite perturbări întrerup aleatoriu procesele succesorale, împiedicînd comunitățile respective să ajungă la o stare de echilibru. Organizarea mai simplă, timpul de generație scurt (20—30 minute în cazul bacteriilor), marile fluctuații numerice populaționale, capacitatea redusă de a induce modificări stabile ale mediului lor fac ca, cel mai adesea, succesiunea normală să nu aibă loc și multe habitate să nu atingă stadiul de climax.

Chiar dacă acest stadiu de echilibru în diversitatea speciilor este atins, el persistă numai rar. O serie de factori perturbatori modifică echilibrul dintre populațiile comunității, stimulează dispariția accelerată a unor specii și facilitează apariția altora, noi (Swift, 1984).

Alexander (1971) include în categoria comunităților de microorganisme ce pot atinge stadiul de climax pe cele din unele ecosisteme acvatice și terestre, din biofiltre și din nămolul activat al stațiilor de epurare a apelor uzate și, probabil, unele comunități din intestinul uman și suprafața rădăcinilor. O comunitate de microorganisme complexă ce atinge stadiul de maturitate este cea din rumen, care include bacterii ce degradează celuloza (*Bacteroides* sp., *Ruminococcus* sp.), bacterii proteolitice (*Veillonella* sp.) și metanogene (*Methanobacterium* sp.), protozoare care degradează celuloza și pectinele (*Polyplas-*

*tron)*, precum și protozoare ciliate care apar tardiv în succesiune, după cum s-a realizat dezvoltarea masivă a bacteriilor (Atlas și Bartha, 1987). Compoziția acestor comunități „finale" este reglată cantitativ și calitativ de o serie de factori cu mare complexitate. Datorită lor, bogăția unor specii poate varia în limite mici, numărul microorganismelor moarte fiind compensat prin multiplicarea celor viabile. În felul acesta, deși viteza lor de multiplicare este mare, densitatea populațiilor respective este relativ echilibrată (Brock, 1963). Factorii perturbatori minori induc modificări aproape invariabil tranzitorii. Imediat după ce factorul perturbator a încetat să mai acționeze, echilibrul tinde să fie restabilit și habitatul revine la starea sa originară.

Comunitățile de microorganisme aflate în stadiul de climax ocupă frecvent regiuni extrem de limitate, fiind situate, adesea, adiacent unor populații aflate în faze de succesiune. Fenomenul este foarte evident în cazul microorganismelor asociate cu rădăcinile plantelor sau în cel al frunzelor, care pot prezenta leziuni locale induse de un agent patogen, înconjurate de microorganisme nepatogene în regiunile sănătoase.

Conceptul de climax este util pentru ecologia microorganismelor, deoarece, deși mai rară decît în cazul altor sisteme biologice, această stare poate exista într-o varietate de habitate populate de microorganisme.

El nu este însă universal aplicabil microorganismelor, multe comunități cu structuri populaționale ușor de modificat sau efemere fiind ușor eliminate.

În unele ecosisteme acvatice sau terestre, modificările fizice sau chimice pot interveni înainte ca o succesiune să atingă stadiul de climax.

În sfîrșit, există și situații speciale ca, de exemplu, în cel al infecțiilor cu patogeni în care nu există succesiune. Prima comunitate care apare, infectînd un organism, este formată dintr-o populație specifică unică, ce se menține pînă cînd mediul este modificat semnificativ, fie prin acțiunea microorganismelor care determină moartea gazdei, fie prin reacțiile răspunsului imun, care determină moartea agentului patogen și vindecarea.

BCU IASI / CENTRAL

# DIVERSITATEA COMUNITĂȚILOR DE MICROORGANISME

**„Măsurătorile diversității descriu heterogenitatea informației în comunitate, atît în termeni de informație totală, care poate fi măsurată ca număr de specii, capacități metabolice sau potențialități genetice, cît și în funcție de modul în care informația este repartizată în comunitate".**

R. A. ATLAS

Este neîndoielnic faptul că unele habitate naturale sînt populate de un număr enorm de microorganisme, în timp ce altele sînt numai slab populate. În unele cazuri, densitatea mare a microorganismelor este asociată cu o concentrație mare de nutrienți (în rizosferă, în litiera pădurilor de foioase, în apele poluate organic etc.). În alte cazuri, medii extrem de bogate în nutrienți, sînt populate doar de un număr limitat de organisme. Așa este cazul mediilor cu mare aciditate, cu concentrație mare de zahăr sau săruri, al țesuturilor animale în cursul tratamentului cu antibiotice etc.

Sub raportul compoziției în specii există, de asemenea, o mare diversitate. În unele situații, întreaga populație aparține unei singure specii (ca în cazul agenților patogeni pentru om, plante și animale) sau este dominant monospecifică, spre exemplu, în cazul „înfloririlor" algale sau al microfungilor care contaminează alimentele. În altele se observă o mare heterogenitate, datorită prezenței a numeroase specii, aparținînd diferitelor categorii de microorganisme (bacterii, fungi, alge, protozoare).

## CONCEPTUL DE DIVERSITATE

Diversitatea, proprietatea sistemelor biologice de a fi distincte (diferite, deosebite) este o caracteristică definitorie a vieții (Solbrig, 1992), o trăsătură a modului de organizare a naturii (Botnariuc, 1992), în absența căreia viața ar fi de neconceput.

Termenul de biodiversitate (derivat de la engl. „Biological diversity") se aplică deopotrivă indivizilor, speciilor, grupărilor taxonomice superioare și populațiilor care alcătuiesc comunitățile de microorganisme.

Pe plan global, numărul speciilor de organisme este apreciat între limite ce variază de la 3 milioane pînă la 30 de milioane sau chiar mai mult (May, 1992). Cel al indivizilor dintr-o specie nu poate fi estimat global datorită variațiilor enorme în timp, de la o specie la alta.

Biodiversitatea are ca substrat molecular variațiile unor macromolecule care codifică informația genetică — moleculele de ADN — și a proteinelor

derivate prin transcrierea și traducerea acestei informații. Suma posibilă a acestor variații este greu de apreciat. *

Biodiversității de bază asigurată de structura genetică relativ invariantă, înscrisă, spre exemplu, în cromosomul bacterian i se adaugă, în cazul microorganismelor, variabilitatea indusă de mutații, de plasmide și de procesele de sexualitate sau de parasexualitate (în cazul bacteriilor), urmate de recombinări genetice.

Procesele determinate de intervențiile umane (transformări ale peisajului natural), modificări ale habitatelor naturale prin cultivarea plantelor, creșterea animalelor, silvicultură, industrializare, eliminarea de substanțe toxice și depunerea lor în ape, sol, pe suprafața plantelor etc., care la scară macroreduc enorma biodiversitate din natură (Jolbrig, 1992), afectează semnificativ și diversitatea comunităților de microorganisme.

## CONCEPTUL MICROBIOLOGIC DE DIVERSITATE

Acest concept se referă la particularitățile și deosebirile calitative morfologice; biochimice, fiziologice, antigenice și genetice, care determină heterogenitatea lumii microorganismelor. Chiar în cazul bacteriilor, aceste deosebiri sînt suficient de mari pentru a putea fi folosite drept criterii de diferențiere și de diagnostic ale diferitelor specii (tabelul nr. 3).

**Diversitatea morfologică** a bacteriilor, spre exemplu, considerată inițial ca limitată la patru tipuri majore (bastonaș, sferic-ovoid, spiralat-helicoidal și filamentos) este, în realitate, mult mai mare, după cum a demonstrat explorarea unor medii naturale (acvatic, sol) obișnuite sau extreme. Ea include în plus:

1) *Bacteriile prostecate* cu cele două subtipuri de bacterii pedunculate („Stalked bacteria") tip *Caulobacter* și bacteriile care înmuguresc („Budding bacteria") tip *Rhodomicrobium vaunielii, Hyphomicrobium vulgare;*

2) *Bacteriile cu apendice celulare:* gen *Gallionella ferruginea;*

3) Bacteriile care formează trichoame *(Caryophanum latum, Leucothrix, Thiothrix, Sphacrotilus);*

4) Bacteriile dispuse în „tablete" sau „în plăci" tip *Lampropedia;*

5) Myxobacteriile fructificante;

6) Bacteriile pătrate (tip *Quadra);*

7) Bacteriile „gigante" (tip *Thiovolum majus*, avînd 18 × 17 μm) etc.

Acestei diversități de formă și dimensiuni i se adaugă cea legată de arhitectura celulară și moleculară (tipul de perete celular, prezența sau absența capsulei, a sporilor etc.), tipul de mobilitate, caracterul Gram-pozitiv sau Gram-negativ, modul de multiplicare, eventual ciclul biologic, structura antigenică etc.

* Datorită structurii codului genetic se estimează că numărul posibil de gene cu o greutate moleculară de $10^6$ dal (respectiv avînd 1 500 nucleotide) este de $4^{1500}$. Această reprezintă o valoare mult mai mare decît numărul de gene care au existat în toate genomurile de la apariția vieții pe Pămînt (Watson, 1974).

*Tabelul nr. 3*

**Elemente de diversificare la procariote**
(modificat, după Atlas, 1984)

| MORFOLOGICE | |
|---|---|
| Mărimea celulei | Înveliș celular; Gram-pozitiv sau Gram-negativ, perete celular, diversitate membranară (lipopolizaharide, protgine, lipide) |
| Forma celulei | Flageli sau alte tipuri de locomoție |
| Flexibilitate sau rigiditate celulară | Prostecă și alte apendice celulare |
| Morfogeneză și ciclu de viață | Pili și fimbrii |
| Endospori, chişti, conidiospori, sporangiospori | „Crampoane" sau alte structuri de adeziune |
| Diviziune celulară binară, înmugurire, fragmentare | Capsulă, zooglee, „teci", alte structuri extracelulare |
| Filamente, trihoame, „multicelularitate" | |
| Mezosomi, tilacoizi, cromatofori | |
| Incluziuni citoplasmatice, vacuole. | |

| RELAȚII DE ASOCIERE | |
|---|---|
| Colonii, clone, asocieri pluricelulare | Asocieri simbiotice |
| Cooperare și competiție | Interacțiuni gazdă—parazit |

| FIZIOLOGICE | |
|---|---|
| Tipul de respirație (aerob obligat > 20% optimum; microaerofil <20%; anaerob obligat, anaerob facultativ, anaerob, aerotolerant). | Fotosinteză și alte efecte ale luminii vizibile |
| Nutriție, mecanisme de conversie a energiei, potențial metabolic, nevoia de factori de creștere, metabolismul carbonului și al azotului | Efectul radiațiilor (UV, X, alte radiații ionizante) |
| Pigmenți (clorofile, carotenoizi etc.) | Temperatura de creștere |
| Echipament enzimatic | Influență pH |
| Metaboliți secundari | Osmofilie |
| Luminescență | Barofilie |
| | Halofilie |
| | Activități metabolice specifice: fixare $N_2$, reducere nitrați, reducere sulfați, metanogeneză, oxidare $NH_3$, oxidare $S^0$ și sulfuri |
| | Sensibilitate la antibiotice |

| GENETICE | |
|---|---|
| Mărimea genomului, structura nucleoidului, multinuclearitatea, % G + C | Secvențializarea ARNr |
| Plasmide, conjugoni, fagi temperați | Izoenzime |

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

## CONCEPTUL ECOLOGIC DE DIVERSITATE

În accepțiune ecologică, diversitatea speciilor (diversitatea ecologică) descrie compoziția în specii a unei comunități (ecosistem) în funcție de numărul speciilor diferite și de abundența lor relativă (Pielou, 1975; Whittaker, 1975; Margalef, 1979). Ea reprezintă o măsură a entropiei comunității, iar indicii de diversitate măsoară gradul de incertitudine cu care un organism individual recoltat aleatoriu dintr-o grupare de specii diferite poate să aparțină unei anumite specii din comunitatea analizată (Legendre și Legendre, 1982).

Cu cît gradul de heterogenitate al populațiilor și al indivizilor din populațiile respective este mai mare, cu atît diversitatea comunității este mai mare.

### Măsurarea diversității speciilor de microorganisme

#### Indicii de diversitate

Pentru aprecierea stării de diversitate ecologică a speciilor și a abundenței lor relative într-o comunitate au fost propuși mai mulți indici matematici. Folosirea lor pentru studiul comunităților de microorganisme este — cel puțin pînă în prezent — limitată, datorită dificultăților specifice ecologiei microorganismelor, de identificare a unui număr mare de specii și de cuantificare a prezenței lor.

Cel mai simplu indice de diversitate a fost propus de Patrick (1949), după care D = n (diversitatea este egală cu numărul de specii). Au urmat o serie de formule de calcul standardizate, propuse de Simpson (1949), Margalef (1951) și alții.

Indicii moderni ca, de exemplu, indicele Shannon — Weaver și Shannon — Wiener (1949, 1963) se referă la doi parametri principali și anume la numărul speciilor diferite dintr-o biocenoză (bogăția speciilor — „Species richness") și la abundența lor relativă în comunități (gradul de uniformitate „Evenness" sau „Equitability"). În felul acesta este apreciat și gradul de heterogenitate a informației stocată în populațiile componente ale comunității, existența unor specii dominante etc.

Atlas și Bartha (1987) recomandă în cazul microorganismelor utilizarea indicelui de diversitate Shannon — Weaver (H), calculat după formula:

$$H = C/N(N \log_{10} N - \sum n_i \log n_i)$$

în care: C = 2,3; N = numărul speciilor, iar $n_i$ = numărul indivizilor din specia *i*.

Importanța determinării gradului de diversitate a comunităților microbiene este apreciată diferit. Mulți cercetători consideră că ea furnizează date importante referitoare la funcțiile ecologice ale ecosistemului. Acestea privesc atît heterogenitatea informației (măsurată în funcție de numărul speciilor, proprietățile lor metabolice sau genetice), cît și modul în care aceasta este distribuită în comunitate.

Prin contrast, Hurlbert (1971) și alți autori (Peet, 1974; Pielou, 1977) consideră că diversitatea speciilor așa cum este definită de o serie de indici nu are nici o semnificație biologică deoarece ei nu permit măsurarea semnifi-

cațici ecologice a unei anumite stări de diversitate sau, mai exact, stabilirea cauzelor datorită cărora o comunitate a dobîndit un anumit grad de diversitate.

## DIVERSITATEA TAXONOMICĂ

Studiul diversității taxonomice are la bază identificarea speciilor din comunitățile de microorganisme, pe criterii obiective. Dificultăților majore, legate în special de identificarea procariotelor, li se adaugă faptul că, după date recente, sînt cunoscute mai puțin de 5% din microorganismele existente în natură și, în plus, majoritatea aparțin diferitelor grupuri cu anumite implicații majore (în primul rînd, patogeni pentru om, animale și plante, microorganisme cu rol în ciclurile biogeochimice, cu importanță industrială etc.). Ritmul de identificare a unor specii noi pentru știință este lent și apreciat la 120 de specii bacteriene și 1 700 de specii fungice/an (Hawksworth, 1992). De altfel, numărul speciilor de microorganisme potențial existente în natură nu este cunoscut. Margulis, Chase și Guerrero (1986) apreciază, pe baza datelor din literatură, numărul microorganismelor cunoscute la aproximativ 200 000, dintre care 20 000 procariote (Starr și colab., 1983), 100 000 fungi (Ainsworth și Sussman, 1978) și 100 000 protiste (Carlis, 1984). Într-o altă lucrare, Margulis și Schwartz (1988) consideră că pe Pămînt ar exista 95 filumuri de organisme, dintre care microorganismele (evident fără virusuri) ar reprezenta 52, iar plantele și animalele 43.

În sfîrșit, Hawksworth (1992), pe baza datelor proprii și a celor publicate de Di Castri și Younès (1990), ca și de Carlis (1991), estimează numărul global al speciilor de microorganisme cunoscute la 152 000, iar al celor existente la 1 690 000 (tabelul nr. 4). Hawksworth (1992) nu exclude posibilitatea unei mai mari diversități taxonomice a lumii bacteriene, marcată de numărul mare de bacterii necultivabile sau greu de studiat cu tehnici actuale. El avansează ipoteza existenței a aproximativ un milion de specii de bacterii din grupul *Mollicutes** aparținînd genului *Spiroplasma*, care ar putea reprezenta cel mai numeros gen din natură.

## DIVERSITATEA ECOLOGICĂ A BACTERIILOR

Aprecierea biodiversității comunităților bacteriene este marcată de dificultățile majore de identificare și cuantificare a prezenței lor într-un ecosistem. Simpla observație morfologică prin microscopie, ca și aspectul culturilor nu corespund exigențelor și rigurozității ce caracterizează stadiul actual al științelor microbiologice. Tehnicile de cultivare sînt selective, deoarece nu există un mediu de cultură universal valabil, capabil să evidențieze totalitatea speciilor dintr-un anumit mediu. Aceasta face ca, în unele cazuri, indicele de diversitate să exprime doar diversitatea unei porțiuni din comunitatea bacteriană, respectiv a acelor grupuri de bacterii (spre exemplu, heterotrofe), care se dezvoltă în condițiile specifice procesului de izolare folosit.

O altă dificultate decurge din necesitatea de a studia un număr mare de tulpini și de a determina un număr important de caractere independente (morfologice, proprietăți chimice, fiziologice, serologice etc.).

Aceste dificultăți și criterii sînt aplicabile și cianobacteriilor („algele albastre-verzi").

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 382.

*Tabelul nr. 4*

**Numărul speciilor virale și biologice cunoscute și al celor considerate ca existente în natură. Denumirile grupurilor sînt utilizate în sens colocvial și nu taxonomic***

| Grupul | Specii cunoscute | Numărul total de specii (estimat) | % specii cunoscute |
|---|---|---|---|
| Virusuri | 5 000 | 130 000 | 4 |
| Bacterii | 4 760 | 40 000 | 12 |
| Fungi | 69 000 | 1 500 000 | 5 |
| Alge | 40 000 | 60 000 | 67 |
| Protozoare | 30 800 | 100 000 | 31 |
| Briofite | 17 000 | 25 000 | 68 |
| Gimnosperme | 750 | ? | ? |
| Angiosperme | 250 000 | 270 000 | 93 |
| Porifere | 5 000 | ? | ? |
| Cnidarii | 9 000 | ? | ? |
| Nematode | 15 000 | 500 000 | 3 |
| Crustacee | 38 000 | ? | ? |
| Insecte | 800 000 | 6—10 000 000 | 8—13 |
| Alte artropode și nevertebrate minore | 132 460 | ? | ? |
| Moluște | 50 000 | ? | ? |
| Echinoderme | 6 100 | ? | ? |
| Amfibieni | 4 184 | ? | ? |
| Reptile | 6 380 | ? | ? |
| Pești | 19 000 | 21 000 | 90 |
| Păsări | 9 198 | ? | 90 |
| Mamifere | 4 170 | ? | 100 |

* După datele lui DiCastri și Younes (1990), McNeely și colab. (1990), Bull și Hardman (1991), *Select committee on Science and technology* (1991, 1992), Bull, Goodfellow și Slater (1992). Semnele de întrebare marchează grupurile cu date incerte.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Primele studii de revizie sistematică, inițiate de Stanier, Rippka și colab. (1979), odată cu încadrarea lor în lumea bacteriilor, au evidențiat necesitatea aplicării unor criterii riguroase de identificare și clasificare, precum și limitele clasificării lor, pe baza Codului Botanic. Din cele 150 de genuri și peste 1 000 de specii descrise pînă în prezent, foarte multe cad în categoria *nomina dubia*, *nomina confusa* și *nomina perplexa*.

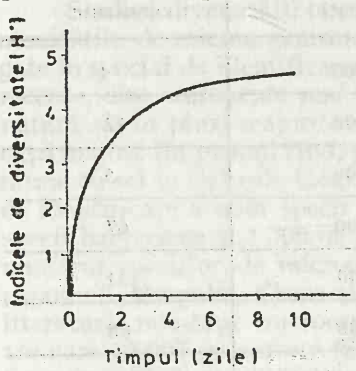



Fig. 13. — Modificări succesionale ale diversității unei comunități planctonice (după Jordan și Staley, 1976).

Concluzia finală este că din cauza acestor dificultăți, metodele actuale subestimează diversitatea reală a comunităților bacteriene. Se explică astfel, limitarea celor mai multe studii populaționale la cîteva grupuri fiziologice (amonificatori, nitrificatori, denitrificatori).

Jordan și Staley (1976) au demonstrat posibilitatea utilizării indicilor de diversitate pentru a urmări evoluția modificărilor succesionale ale unei comunități. În acest sens, utilizînd grile submerse, pe care le-au examinat la microscopul electronic, au studiat evoluția unei comunități de perifiton în lacul Washington. Diversitatea măsurată pe o perioadă de 10 zile a crescut de la indicele de diversitate (H') = 3,1 în prima zi, la 4,2 la 3 zile și la 4,8 după 10 zile (fig. 13).

Diversitatea redusă a populațiilor-pionier crește în această perioadă spre o diversitate mai mare și mai stabilă a comunității în stadiul de climax. În plus, unele populații-pionier reprezentate predominant de eubacterii heterotrofe dispar, pentru ca, ulterior, să predomine cianobacteriile și algele.

Kanenko și colab. (1977), studiind comunitățile bacteriene din regiunile apropiate de țărm ale mării Beaufort, au evidențiat existența unei relații inverse între diversitatea speciilor și biomasa bacteriană (numărul celulelor) în apele de suprafață. Această observație este interpretată în acord cu principiul că populațiile dezvoltate în habitate cu resurse limitate de nutrienți reflectă succesul cîtorva specii relativ bine adaptate la condițiile respective. Au înregistrat, de asemenea, unele fluctuații sezoniere, în sensul predominanței bacteriilor pigmentate vara (protejate de pigmenți față de acțiunea nocivă a radiațiilor solare) și înlocuirea lor iarna de bacteriile nepigmentate.

În sfîrșit, sedimentele marine, indiferent de locul de recoltare a probelor, prezintă un nivel ridicat de biodiversitate, caracteristic comunităților biologice adaptate. Această uniformitate pledează, în plus, pentru lipsa unui stres reprezentat de anumiți factori de mediu.

**Diversitatea algelor** poate fi studiată relativ mai ușor, datorită posibității de identificare pe criterii pur morfologice. Tehnica are, totuși, un inconvenient major, decurgînd din imposibilitatea de a deosebi algele vii de cele moarte. Frecvent, gradul de diversitate poate fi mărit artificial prin includerea algelor alohtone moarte. În anumite medii, frecvența celulelor moarte este foarte mare și, în cîteva studii, riguros controlate, s-a demonstrat că numărul algelor vii și diversitatea lor sînt semnificativ mai mici decît în cazul celor care includ global algele vii și moarte (Wilson și Holmes, 1981). Separarea lor este dificilă, dar esențială pentru aprecierea funcționalității comunităților lor.

**Diversitatea protozoarelor** este puțin studiată, deși, ca și în cazul algelor, multe specii pot fi recunoscute pe bază morfologică. În mediile acvatice este mai mare în stratul de „litieră" de pe fundul lacurilor decît în sedimente sau în coloana de apă. Predomină speciile de protozoare bacterivore, care prezintă două perioade de densitate maximă (primăvara și toamna tîrziu) corelate cu densitatea maximă a bacteriilor.

## DIVERSITATEA FIZIOLOGICĂ A BACTERIILOR

Cel mai adesea, studiile de diversitate se rezumă la diversitatea taxonomică și includ liste mai mult sau mai puțin complete de microorganisme prezente într-un anumit habitat. Diversitatea fiziologică este subtextuală și oarecum mai elocventă în cazul grupurilor de bacterii cu funcții foarte specializate (ca, de exemplu, bacteriile nitrificatoare, denitrificatoare, fixatoare de azot, celulozolitice etc.). Diversitatea taxonomică are, totuși, o semnificație limitată, deoarece nu furnizează unele date esențiale ca, de exemplu: cauzele heterogenității unei comunități, particularitățile fiziologice ale populațiilor de microorganisme componente (potențialul de biosinteză sau de catabolism, capacitatea de a produce exoenzime, de a utiliza un anumit compus), natura condițiilor de mediu etc. și, în general, a factorilor care interacționează pentru a determina structura comunității.

În consecință, fără a contesta valoarea studiilor de diversitate taxonomică, în descrierea comunităților de microorganisme este evident clară necesitatea extinderii demersului ecologic la diversitatea fiziologică și genetică a comunităților de microorganisme, respectiv la totalitatea activităților potențiale și a interacțiunii populațiilor care trăiesc împreună.

Diversitatea biochimică și fiziologică se bazează pe variațiile asociate cu natura echipamentului enzimatic, tipul de metabolism (autotrof, heterotrof, chemosintetic sau fotosintetic), tipul respirator, exigențele de temperatură, pH, natura metaboliților secundari, particularitățile de cultivare, toleranța la diferite condiții de mediu (osmofilie, barofilie, halofilie etc.).

## DIVERSITATEA GENETICĂ A BACTERIILOR

Se referă la variațiile determinate de organizare genetică: structura cromosomului, % G + C, prezența și natura plasmidelor, a fagilor temperați etc. Reflectînd compoziția genetică a speciilor care apar asociate într-o comunitate, diversitatea genetică determină bazele reale ale heterogenității unei comunități. *

Demersul genetic are o particularitate aparent în contradicție cu studiul diversității taxonomice bazat pe presupunerea fundamentală că toți indivizii aceleiași specii au aceleași particularități și că toate perechile de specii diferite sînt deopotrivă diferite (Hendrickson și Ehrlich, 1971). Or, la nivel molecular, după cum demonstrează studiile de genetică bacteriană, acest lucru nu este real. La majoritatea microorganismelor studiate, clusterii fenetici nu sînt omologi din punct de vedere genetic.

În cazul bacteriilor, aceste diferențe sînt determinate, în special, de înaltul potențial de transfer de gene mediat de plasmide și de elementele genetice

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 75.

transpozabile, realizabil nu numai intraspecific, ci și interspecific și intergeneric. Cu toate acestea, diversitatea genetică la nivel molecular nu afectează esențial datele furnizate de studiile taxonomice. Există o tendință fundamentală de păstrare a identității taxonomice și fenotipice, manifestată prin capacitatea de menținere nealterată a genelor esențiale prezente în structura cromosomului bacterian, care codifică proprietățile definitorii ale unei specii bacteriene. Această tendință explică, în cazul unor bacterii bine studiate *(Escherichia coli)*, menținerea identității sale genetice de bază și a caracterelor care permit identificarea riguroasă, deși „fluxul" plasmidelor a fost, probabil, continuu în condiții naturale.

În același timp, este de menționat faptul că unele studii recente, de mare finețe (ca, de exemplu, determinarea secvenței de baze în ARNr 5S), demonstrează o neobișnuită și neașteptată heterogenitate genetică în grupul procariotelor. Astfel, fără a contesta realitatea deosebirii fundamentale dintre procariote și eucariote, aceste studii au demonstrat că sub raport genetic, grupul *Archaebacteria* este mai înrudit cu eucariotele decît cu procariotele. Această concluzie are implicații legate de descifrarea primelor etape ale evoluției biologice. Ele pledează pentru caracterul primordial al Eubacteriilor (sub forma bacteriilor Gram-negative), din care a evoluat *Archaebacteria*, ca formă de viață premergătoare eucariotelor.

Pentru a ilustra această succesiune, Hori (1992) consideră că denumirea de *Archaebacteria* este în contradicție cu relațiile evolutive dintre eubacterii și eucariote și propune încadrarea lor ca regnul *Metabacteria* (gr. meta = = după) (Hori și Osawa, 1987; Iwabe și colab., 1989).

Gradul de heterogenitate genetică al unei comunități de microorganisme este corelat cu capacitatea comunității respective de a răspunde la fluctuațiile mediului și, în felul acesta, cu stabilitatea ei. Comunitățile cu o diversitate genetică redusă sînt mai puțin capabile să se confrunte cu un stres sever din mediu, decît cele cu o heterogenitate mare, care au flexibilitatea necesară pentru a rezista acestor situații (Atlas, 1984).

Diversitatea genetică a unei comunități de microorganisme este, în mod evident, corelată cu resursele energetice disponibile în habitatul respectiv.

Tehnicile genetice permit înțelegerea gradului de diversitate, respectiv de heterogenitate al unei comunități și implicit înțelegerea structurii acesteia. În acest sens este de menționat studiul lui Torsvik (1980), care a determinat gradul de heterogenitate genetică a comunităților de microorganisme, utilizînd tehnica de denaturare/renaturare a ADN *. El propune testarea directă a diversității genetice în funcție de aspectul curbei de renaturare („Reannealing"), ca o măsură a gradului de heterogenitate a ADN pentru totalitatea comunității de microorganisme.

O curbă înaltă de refacere indică un grad înalt de omologie genetică, respectiv existența unor populații dominante, corespunzînd unei heterogenități genetice limitate sau unei comunități cu diversitate mică.

---

* ADN dublu catenar poate fi „denaturat" sub acțiunea temperaturii (63 — 100°C) sau a unor agenți chimici, care rup legăturile dintre baze și îl convertesc la structuri monocatenare. Denaturarea termică sau „topirea" (engl., „Melting") este urmată, în cazul răcirii lente, de o refacere a structurii ADN d.c. prin renaturare („Annealing") pe baza reconstruirii legăturilor dintre moleculele de ADN m.c., pe criterii de omologie.

Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 35.

O curbă joasă de reasociere a catenelor de ADN m.c. este un test pentru un grad mare de heterogenitate genetică, caracteristic unei comunități cu o mare diversitate de specii de microorganisme.

**Cauzele biodiversității microorganismelor** nu sînt cunoscute.

După Alexander (1971), heterogenitatea microbiotei unui habitat este legată de natura acestuia, de numărul speciilor care au acces la el, de numărul celor capabile să competiționeze între ele și cu factorii de mediu etc.

Spre deosebire de mediile fizic sau chimic omogene, habitatele naturale sînt spațial heterogene sau au caracteristici a căror intensitate fluctuează în timp.

Diversitatea speciilor de microorganisme poate fi determinată de lipsa de omogenitate spațială și/sau modificările care au loc în timp. Diferențele spațiale pot fi reprezentate de gradiente sau variații ale unui singur factor de mediu (o regiune mai acidă sau mai alcalină, un conglomerat de nutrienți etc.). Datorită diversității spațiale, diversitatea speciilor poate fi imensă. În același timp, unele variații sezoniere pot fi răspunzătoare de fluctuația în intensitate a unei variabile ecologice în timp.

Diversitatea speciilor variază de la un ecosistem la altul. Diversitatea cea mai redusă a speciilor caracterizează ecosistemele în care intensitatea unuia sau mai multor factori ecologici se apropie de condițiile extreme de toleranță a vieții (spre exemplu, mediile care reduc microbiota la microorganismele termofile, halofile, xerofile, osmofile). În aceste medii, microorganismele alohtone nu se pot multiplica și nu pot supraviețui.

Diversitatea este foarte mare în anumite comunități algale din ape și din sol, în care nici o specie nu este în mod evident predominantă.

Populațiile puțin abundente și cu mare diversitate de specii par să fie asociate cu deficitul de nutrienți. Cînd are loc un influx de nutrienți, diversitatea scade, pentru că aceste condiții favorizează, probabil, una sau cîteva specii. În mediile sărace în nutrienți, dar care permit totuși creșterea microorganismelor, nici o specie nu este în mod special avantajată (Alexander, 1971).

## Relația dintre diversitate și productivitate

Studiile efectuate asupra comunităților de fitoplancton au arătat că dominanța unor populații de microorganisme este direct corelată cu productivitatea și invers corelată cu diversitatea și stabilitatea.

Diversitatea unei comunități este mecanismul principal care generează stabilitatea ei, în timp ce dominanța este, în principal, un mecanism care generează productivitatea ei (producerea de biomasă).

Maturitatea comunității este reflectată atît în productivitate, cît și în diversitate (Margalef, 1968, 1979). Ecosistemele mature sînt complexe, au o

mare diversitate (prezintă un număr mare de specii) și numeroase relații interspecifice. Un ecosistem cu structură complexă, bogat în informație, reflectată prin abundența mare de specii are nevoie de o cantitate mică de energie pentru menținerea structurii sale. Această nevoie redusă de aport energetic pentru menținerea diversității este reflectată într-o rată mai redusă a producției primare per unitate de biomasă, în timp ce nivelul stabil de diversitate este menținut (Atlas, 1984).

Revelante și Gilmartin (1980) sprijină teoria unei relații inverse între diversitate și productivitate, evidențiind faptul că această relație inversă este, în special, marcată cînd modificările de mediu favorizează creșterea rapidă a fitoplanctonului. Astfel, în mediile acvatice cu conținut mic de nutrienți și biomasă de fitoplancton redusă, diversitatea speciilor crește. Invers, cînd datorită unor deversări masive de nutrienți se creează condiții pentru apariția „înfloririlor" algale, se dezvoltă comunități fitoplanctonice cu biomasă mare și diversitate mică de specii.

Datorită relațiilor dintre diversitate și productivitate, măsurătorile densității furnizează informații importante privind înțelegerea proceselor de eutrofizare.

## Efectul factorilor de stres din mediu asupra biodiversității comunităților de microorganisme

Observațiile privind efectul factorilor de mediu (poluanți, efluenți industriali, deversări de țiței etc.) sînt relativ numeroase.

Spre deosebire de habitatele nepoluate, în care specii numeroase sînt reprezentate de un număr relativ mic de indivizi, poluanții elimină speciile mai sensibile, reduc interacțiunile competitive și favorizează proliferarea speciilor tolerante la stres. În felul acesta, numărul speciilor este diminuat, dar numărul indivizilor din fiecare specie este crescut. Face excepție, evident, cazul în care stres-ul este foarte sever și determină eliminarea întregii colectivități.

Peele (1981), studiind efectele eliminării apelor reziduale provenite de la o fabrică de medicamente în mare, a evidențiat modificarea compoziției taxonomice în regiunea poluată. Bacteriile Gram-negative (*Vibrio*, *Pseudomonas* etc.), normal dominante, sînt înlocuite de bacterii Gram-pozitive (*Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp.), normal numai foarte rar izolate din apele de suprafață.

În mod asemănător, diversitatea algelor este mult diminuată. Astfel, Patrick (1976) a evidențiat diminuarea diversității algelor în apele poluate comparativ cu cele relativ curate (fig. 14), iar Nelson și colab. (1976) au demonstrat că administrarea insecticidelor scade biodiversitatea diatomeelor din sol, ca o consecință a diminuării calității mediului.

De asemenea, Eloranta și Kettunen (1979) au descris transformările comunităților de microorganisme determinate de efluenții unei fabrici de celuloză. În comparație cu situația din amonte, biodiversitatea este redusă enorm în apropiere de locul de deversare a apelor uzate, iar populațiile de microorganisme sînt reduse la cîteva specii dominante.

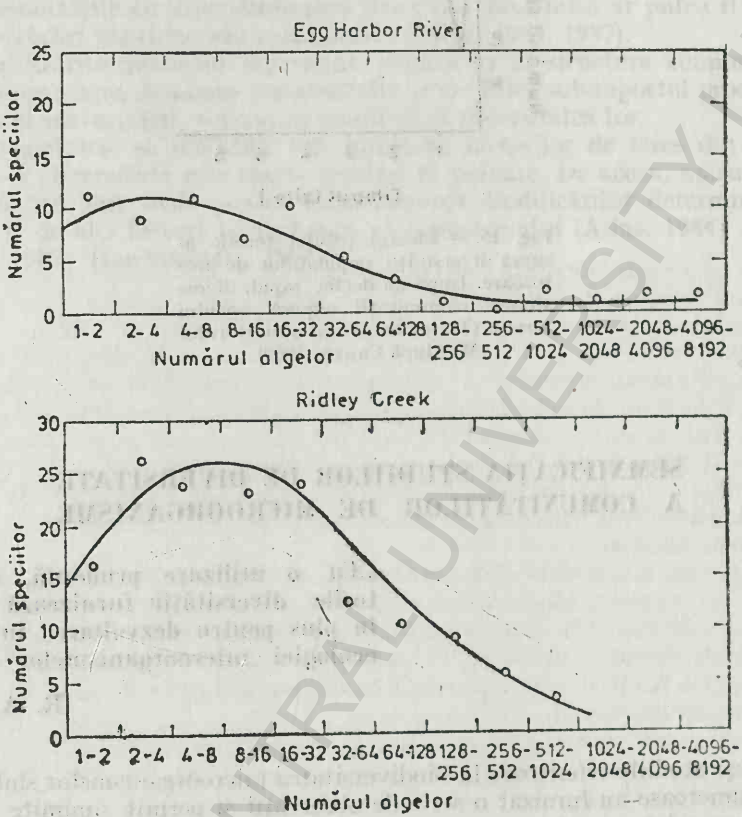



Fig. 14. — Structura comunităților de diatomee acvatice. Graficul prezintă numărul speciilor din două probe de apă, raportat la numărul indivizilor din speciile respective. Comunitatea de diatomee din riul Egg Harbor, intens poluat, conține mai puține specii, dar numărul organismelor din unele populații este foarte mare (după Patrick, 1963).

Factorii de stres din mediu afectează într-un mod similar și diversitatea protozoarelor. Cairns (1969) a demonstrat că numărul speciilor de protozoare de apă dulce este afectat de șocul termic temporar. Diversitatea scade cîteva zile după șoc, pentru a reveni ulterior la nivelul comunității martor, neexpusă șocului (fig. 15). El a propus utilizarea comunităților de protozoare cultivate pe diferite substrate artificiale pentru detectarea stresului determinat de poluare.

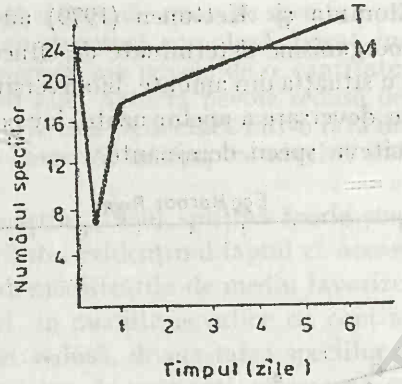



Fig. 15. — Efectul şocului termic asupra diversităţii populaţiilor de protozoare. După un declin rapid, diversitatea comunităţii expusă şocului termic (T) revine la cea a martorului (M) (după Cairns, 1969).

## SEMNIFICAŢIA STUDIILOR DE DIVERSITATE A COMUNITĂŢILOR DE MICROORGANISME

**„Cu o utilizare prudentă, măsurătorile diversităţii furnizează o cale în plus pentru dezvoltarea înţelegerii ecologiei microorganismelor".**

R. A. ATLAS

Deşi studiile referitoare la biodiversitatea microorganismelor sînt relativ puţin numeroase au furnizat o serie de observaţii şi permit anumite concluzii, în general în acord cu conceptele Ecologiei generale:

Populaţiile de microorganisme care ocupă un anumit habitat stabilesc o serie de relaţii interpopulaţionale, care duc la formarea unei structuri definite a comunităţii. Ele evoluează printr-o serie de stadii succesionale, în direcţia realizării unei comunităţi stabile la un anumit nivel de diversitate, care asigură o utilizare optimă a fluxului de energie din ecosisteme şi o anumită homeostazie, respectiv un grad de invarianţă şi de rezistenţă la factori perturbatori din mediu. În felul acesta, diversitatea unei comunităţi reflectă stadiul interrelaţiilor populaţionale din comunitate în termeni dinamici.

În acest cadru există o corelaţie negativă între diversitatea speciilor şi numărul indivizilor din fiecare specie: numărul redus al speciilor într-o comunitate este compensat prin numărul mare („bogăţia") al indivizilor.

Diversitatea speciilor este un parametru corelat cu gradul de stabilitate a comunităţii de microorganisme. Comunităţile cu mare diversitate de specii sînt adesea mai rezistente la modificări decît cele puţin diverse. Ca probă,

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

comunitățile de bacterii și fungi din sol, ca și microbiota tubului digestiv sînt puțin afectate de stres-ul moderat din mediu, care nu modifică semnificativ nici mărimea, nici tipurile de microorganisme indigene. În schimb, în cazul comunităților acvatice, chiar o fluctuație ecologică minoră poate avea un efect exploziv, eliminînd sau reducînd abundența unei specii majore și permițînd unei specii minore să devină predominantă.

Comunitățile cu diversitate prea mare sau prea mică ar putea fi expuse unor modificări continue sau catastrofice (Atlas, 1984, 1987).

Modificările mediului determină modificări în structura comunităților de microorganisme. Așa cum comunitățile se modifică sub raportul productivității sau al maturității, tot așa se modifică și diversitatea lor.

Diversitatea se modifică sub influența factorilor de stres din mediu. Indicele de diversitate este foarte sensibil la poluare. De aceea, măsurătorile biodiversității sînt utile pentru monitorizarea modificărilor determinate de poluare și de alți factori perturbatori ai ecosistemului (Atlas, 1984; Atlas și Bartha, 1987; Hawksworth, 1992).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# NUTRIȚIA ȘI CREȘTEREA MICROORGANISMELOR ÎN MEDIILE NATURALE

**„Cunoașterea detaliată a proprietăților fiziologice ale microorganismelor în experiențe de laborator permite nu numai înțelegerea rolului lor în mediile naturale, ci și rațiunea proceselor evolutive care au acționat spre o diversitate și specializare extreme ale speciilor".**

D. W. TEMPEST
O. M. NEIJSSEL
W. ZEVENBOOM

Ca orice alte organisme vii, microorganismele au nevoie pentru creștere și multiplicare, ca și pentru manifestarea activității lor biologice de prezența în mediul înconjurător a unor substanțe nutritive, care să conțină, pe de o parte, elementele chimice necesare pentru sinteza constituenților celulari, pentru activitatea enzimelor și sistemelor de transport, și, pe de altă parte, să le furnizeze substanțele necesare pentru producerea de energie biologic utilizabilă. Din cauza heterogenității mediilor naturale sub raport populațional și al nutrienților prezenți, precum și datorită dificultății de a pune la punct tehnici fiabile de identificare și dozare a diferitelor substanțe prezente în jurul celulelor microbiene, cunoștințele referitoare la procesele de nutriție în natură sînt foarte limitate.

Cele mai multe date sînt rezultatul unor studii de laborator.

Unele elemente biogene sînt necesare în concentrații mari ($10^{-4}$M). Sînt deci *macroelemente*. Cele mai importante sînt: C, O, H, N, S, P, K, Mg, Ca și Fe. Dintre acestea, C, O, H, N, S și P formează 95% din greutatea celulară uscată a bacteriilor și reprezintă bioelemente majore ale biomasei microorganismelor în general.

*Bioelemente minore* (micronutrienții sau microelementele) sînt necesare în cantități extrem de mici. Ele includ elemente ca: Zn, Mn, Na, Cl, Se, Co, Cu, W, Ni și Mo. Unele (Zn, Mn) sînt necesare pentru toate microorganismele, în timp ce altele (Se, Mo, Co, Cu, W), numai pentru activități speciale.

În funcție de tipul de metabolism al microorganismelor, bioelementele sînt folosite fie ca atare, fie cel mai frecvent, sub forma a diferite combinații. Ele se pot prezenta sub trei forme:

1) **Substanțele anorganice** sînt prezente sub formă de: a) gaze: $O_2$, $CO_2$, $N_2$, CO, $H_2$, $N_2O$, $H_2S$ etc.; b) cationi: $NH_4^+$, $Fe^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Si^{4+}$, $Na^+$, $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Mo^{3+}$, $Cu^{2+}$, $Va^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Zn^{2+}$ etc.; c) anioni: fosfat, carbonat, bicarbonat, sulfat, nitrit, nitrat, clorat, bromat, fluorat, silicat etc.

2) **Substanțele organice** prezintă o gamă largă de diversitate și de complexitate chimică. Unele sînt ușor accesibile, altele rezistente sau chiar recalcitrante la metabolizarea lor de către microorganisme. Natura lor este frecvent corelată cu dezvoltarea anumitor populații de microorganisme cu activități metabolice specifice. Unele microorganisme *(copiotrofe)* au nevoie de cantități relativ mari de materie organică în mediu, în timp ce altele *(oligotrofe)* se dez-

voltă numai la concentrații foarte mici. Cele mai multe substanțe organice au valoare de nutrient, însă unele pot exercita efecte inhibitoare sau chiar toxice (alcooli, fenoli, acizi carboxilici, compuși organoclorurați, hidrocarburi, antibiotice etc.).

3) **Factorii de creștere**, respectiv substanțele de tipul vitaminelor microbiene (biotină, tiamină, riboflavină, acid folic, acid pantotenic, acid nicotinic, unii aminoacizi etc.), sînt necesari tuturor microorganismelor. Diferențele decurg din faptul că unele sînt capabile să-i obțină prin activitatea proprie de biosinteză, în timp ce altele (mutantele auxotrofe) trebuie să-i preia ca atare din habitat sau de la alte organisme (microorganisme, plante, animale).

Macronutrienții sînt utilizați ca precursori sau ca materiale de construcție în sinteza macromoleculelor celulare. Micronutrienții sînt folosiți, adeseori, cu un grad mare de selectivitate, nevoile fiind diferite de la o specie la alta. De aceea, frecvent, ei influențează prezența sau absența microorganismelor într-un habitat.

## TIPURILE DE NUTRIȚIE A MICROORGANISMELOR

În raport cu natura sursei de carbon, microorganismele au fost grupate în două categorii majore:

1) **Autotrofe**, care folosesc $CO_2$ ca sursă unică sau principală de carbon celular.

2) **Heterotrofe** *(organotrofe)*, care folosesc ca sursă de C pentru biosinteze și producere de energie substanțele organice.

Acești termeni sînt folosiți în mod curent, deși practica a demonstrat că marea varietate a modalităților de nutriție proprii microorganismelor nu poate fi exprimată numai în funcție de natura sursei de carbon. De aceea, au fost adăugate criterii suplimentare ca natura sursei de energie, natura substanțelor folosite ca donatori sau acceptori de H sau electroni (tabelul nr. 5).

În funcție de modul de obținere a energiei, microorganismele aparțin, de asemenea, la două categorii distincte:

1) **Fototrofe** *(fotosintetizante)*, care folosesc energia radiantă luminoasă și

2) **Chemosintetizante**, care obțin energia prin reacții chimice.

Ca și în cazul nutrienților, în orice ecosistem natural, energia poate varia uneori foarte mult, în așa fel încît microorganismele se pot confrunta fie cu un exces, fie cu un deficit de energie. Aceste variații sînt întîlnite atît în cazul microorganismelor chemotrofe, cît și în cel al fototrofelor (energia solară fiind numai periodic disponibilă). Față de aceste fluctuații, microorganismele își modulează permanent rata reacțiilor producătoare de energie, pentru a fi în concordanță cu reacțiile consumatoare de energie și pentru a asigura menținerea celulelor.

În condiții de limitare energetică, microorganismele își ajustează automat rata reacțiilor anabolice (consumatoare de energie), diminuînd sinteza diferiților polimeri celulari și realizînd sinteza echilibrată a constituenților la o rată submaximală sau punînd în acțiune mecanisme enzimatice alternative pentru compensarea deficitului. Astfel, la microorganismele aerobe și facultativ anaerobe heterotrofe, limitarea cantității de $O_2$ disponibil este urmată de sinteza

---

* Vezi *Trat at de microbiologie generală*, vol. II, p. 27.

*Tabelul nr. 5*

**Principalele tipuri de metabolism bacterian, în funcție de natura surselor de C, de energie și a donatorului de H**

| Tipul de metabolism | Sursa de carbon | Sursa de energie sau de electroni | Donatorul de hidrogen | Exemple |
|---|---|---|---|---|
| Fotolitoautotrof | $CO_2$ | Radiațiile luminoase | $H_2O$, $H_2S$, $H_2$ | *Cyanobacteriales*<br>*Chromatiaceae*<br>*Chlorobiaceae* |
| Fotoorganoheterotrof | Compuși organici | Radiațiile luminoase | Compuși organici | *Rhodospirillaccae* |
| Chemolitoautotrof | $CO_2$ | Oxidarea unor compuși anorganici | Compuși anorganici reduși ($NH_3$, $NO_2^-$, $H_2S$, S, $Fe^{2+}$, $H_2$) | Nitritbacterii, nitratbacterii, ferobacterii, *Thiobacillus*, bacterii metanogene și acetogene |
| Chemoorganoheterotrof | Compuși organici | Oxidarea unor compuși organici | Compuși organici | *Bacillus sp.*, *Clostridium* sp. *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas* sp. etc. |

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de terminal oxidaze cu mare afinitate pentru $O_2$ și de enzime ce furnizează acceptori de electroni alternativi (Tempest, Neijssel și Zavenboom, 1983). La fototrofe, deficitul de lumină induce derepresia sintezei de pigmenți de antenă (van Liere, 1979).

Reglarea este mai complicată și mai puțin cunoscută în cazul excesului de energie în mediu. El antrenează modularea vitezei de producere a ATP, pentru a fi în concordanță cu necesitățile creșterii sau intrarea în acțiune a unor mecanisme care determină disiparea excesului de energie (Hoogerheide, 1975).

Microorganismele chemoheterotrofe sînt dependente de compuși organici ca sursă de C și energie. Ele pot fi clasificate după natura sursei organice ca:

1) **Saprotrofe** — care obțin compușii organici din mediul înconjurător neanimat.

2) **Simbiotrofe** — care preiau compușii organici direct de la alt organism cu care trăiesc într-un contact intim permanent.

3) **Biotrofe** — respectiv capabile să obțină substanțele organice din celulele vii ale gazdei simbiotice.

4) **Necrotrofe** — care obțin compușii organici din celulele moarte ale gazdei simbiotice.

În funcție de modul în care obțin substanțele necesare ca sursă de nutrienți și de energie pentru biosinteze, microorganismele chemoheterotrofe formează două grupe distincte:

1) **Microorganismele osmotrofe** (bacterii, microfungi, microalge), care preiau substanțele dizolvate din mediu prin transfer prin membranele celulare „moleculă cu moleculă" sau „ion cu ion" și

2) **Microorganismele fagotrofe**, care înglobează substanțe particulate, pe care le digeră înainte de a utiliza produșii de digestie (fig. 16). Microorganismele fagotrofe sînt adaptate mai degrabă să acționeze ca prădători ai osmotrofelor decît să competiționeze cu ele. Osmotrofele competiționează între ele pentru nutrienții solubili, iar fagotrofele fac același lucru pentru constituenții particulați.

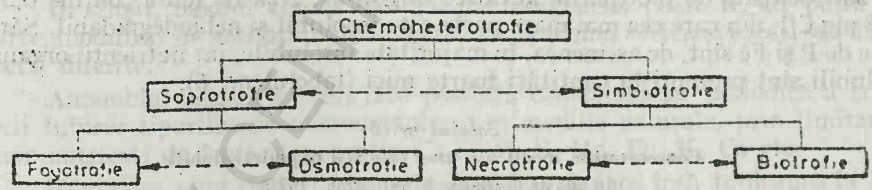



Fig. 16. — Reprezentarea schematică a tipurilor de nutriție chemoheterotrofă. Liniile întrerupte indică faptul că un anumit microorganism poate aparține facultativ fiecăruia din cele două modalități de nutriție indicate de săgeți (după Lewis, 1974).

Lewis (1974) a propus o clasificare ecologică a microorganismelor chemoheterotrofe, în funcție de particularitățile de nutriție și de gradul de dependență de alte organisme:

1) **Saprofite obligate libere** („Ecologically obligately free-living saprotrophs") reprezentate de microorganisme heterotrofe libere, lipsite de capacitatea de simbioză mutualistă sau parazitară.

2) **Facultativ necrotrofe,** grup heterogen, format din microorganisme cu potențial simbiotic, normal libere, cu nutriție saprotrofă, dar care pot adopta o existență parazitară, în cursul căreia prezintă o nutriție necrotrofă.

3) **Necrotrofe obligate.** Considerat ca forma extremă a tipului de nutriție precedent, acest tip de nutriție include paraziții specializați, a căror existență liberă (altfel decît ca spori, chişti sau gameți) este limitată la supraviețuirea în țesutul mort al gazdei infectate.

4) **Facultativ biotrofe,** reprezentate de microorganisme facultativ simbiotice, cu oarecare capacitate de existență liberă. Sînt biotrofe în stadiul simbiotic și saprotrofe în cel liber.

5) **Obligate biotrofe** („Ecologically obligately symbiotic biotrophs"), care reprezintă forma extremă a grupului precedent. Include microorganisme simbionte mutualiste sau parazitare, lipsite de capacitatea de existență liberă în altă formă decît ca spori sau chişti.

## PREZENȚA NUTRIENȚILOR ÎN MEDIILE NATURALE

Majoritatea informațiilor referitoare la exigențele de nutriție ale microorganismelor sînt rezultatul cultivării lor pe medii artificiale, în general foarte bogate în substanțe imediat și ușor accesibile. În schimb, se știe foarte puțin despre chimia microhabitatelor din natură, din cauza dificultăților majore de explorare a acestora. Deși în ultimii ani au fost construiți electrozi pentru determinarea concentrației $O_2$ și a unor ioni în microhabitate, cele mai multe cunoștințe sînt bazate pe observații simulate în laborator și pe extrapolarea lor la caracteristicile microhabitatelor (ape dulci, marine sau sol).

Mediile naturale sînt foarte heterogene sub raportul conținutului lor în nutrienți. Deși biosfera conține o varietate infinită de ecosisteme, o foarte mare parte dintre ele sînt asociate cu habitate neospitaliere al căror conținut în nutrienți este apropiat de cele mai scăzute limite posibile pentru dezvoltarea microorganismelor. Această afirmație este susținută de calculele lui Shilo (1980), care apreciază că 70% din suprafața biosferei și peste 90% din volumul ei sînt ocupate de biotipurile acvatice oligotrofe. Apa de mare conține 0,5—0,8 mg C/l, din care cea mai mare parte este insolubil și nebiodegradabil. Sărurile de P și Fe sînt, de asemenea, în majoritate insolubile, iar nutrienții organici solubili sînt prezenți în cantități foarte mici (tabelul nr. 6).

*Tabelul nr. 6*

**Concentrațiile medii ale unor compuși organici solubili în apa de mare** (după Williams, 1975)

| Compușii | Concentrația (μg C/l) |
|---|---|
| Vitamina $B_{12}$ | 0,0005 |
| Tiamină | 0,005 |
| Biotină | 0,001 |
| Uree | 5,0 |
| Acizi grași (total) | 5,0 |
| Glucide libere | 10,0 |
| Total glucide | 200,0 |
| Aminoacizi liberi | 10,0 |
| Aminoacizi combinați | 50,0 |

Or, după cum s-a demonstrat, importantă nu este concentrația globală a unui nutrient în natură, ci disponibilitatea lui imediată pentru a fi utilizat de microorganisme. Cel mai adesea însă, partea imediat disponibilă este extrem de mică în comparație cu rezerva totală a unui compus, detectată prin metode chimice din mediu. Un exemplu care ilustrează această afirmație este cel al bacteriilor care au nevoie de anumite gaze ($H_2$, $CH_4$ etc.) în formă solubilă. Chiar în cazurile în care pot fi prezente în atmosferă în concentrație mare, solubilitatea lor redusă în apă face ca disponibilitatea pentru metabolismul microorganismelor să fie redusă.

În multe cazuri, cea mai-mare parte dintre nutrienți sînt asociați cu particule solide, cu mare complexitate structurală cu coloizi sau cu agenți chelatori. Unele modificări fizico-chimice (adsorbția pe argile în sol, precipitarea sau conversia la o stare oxidată etc.) fac mulți nutrienți neutilizabili.

Eliberarea nutrienților din compușii insolubili este uneori foarte lentă, în așa fel încît formele solubile sînt prezente doar în concentrații nanomoleculare, care nu permit creșterea microorganismelor la potențialul lor maxim (Konings și Veldkamp, 1983).

Unii nutrienți sînt prezenți în mediu în mod continuu (spre exemplu, în regiunea periradiculară a plantelor, în țesuturile organismelor superioare infectate, în stațiile de epurare a apelor uzate etc.). Alteori, nutrienții apar periodic (discontinuu), frecvent la intervale rare sau neregulate, determinînd mari fluctuații numerice ale populațiilor de microorganisme.

În general, microorganismele din mediile acvatice, precum și cele din sol care pot fi frecvent lipsite brusc de nutrienți disponibili, tolerează mai bine variațiile de concentrație și chiar deficitul nutrițional decît cele adaptate la viață în medii bogate în nutrienți (ca, de exemplu, în organismul animal).

Microorganismele trăiesc în natură nu numai în gradiente de concentrații de nutrienți, ci și în gradiente de pH, $E_h$ etc., care, în anumite medii, influențează ritmul de preluare a nutrienților solubili. Este evident că microorganismele dintr-un ecosistem răspund diferit în funcție de poziția lor în gradientul respectiv. Situația este complicată de faptul că în natură condițiile de mediu se schimbă continuu, ceea ce face ca proprietățile fiziologice ale celulelor să se găsească într-o stare dinamică, tranzitorie.

În sfîrșit, mediul chimic al unui microorganism poate fi, cel puțin în parte, modificat de activitatea altor celule, aparținînd aceleiași specii sau unor specii diferite.

Ansamblul acestor factori face posibilă contracararea periodică a creșterii tuturor tipurilor de microorganisme în mediile naturale, prin limitarea unor nutrienți de bază care conțin C, N, P, S, Mg, Fe, K, Ca etc.

Epuizarea unui nutrient esențial specific nu duce însă totdeauna la suprimarea creșterii. *Streptococcus faecalis* lipsit de un anumit aminoacid încetează să sintetizeze proteine, dar continuă să producă perete celular.

Habitatul este sursa tuturor nutrienților necesari microorganismelor viabile. Datorită dependenței totale a acestora de mediul înconjurător, în absența altor condiții nefavorabile de mediu, absența unei specii dintr-un anumit habitat poate fi atribuită lipsei unuia sau mai multor nutrienți din mediul respectiv.

**Regenerarea nutrienților** este un fenomen complex prin care substanțele organice rezultate din asimilarea nutrienților sînt degradate și uneori mineralizate la forme din nou accesibile altor microorganisme. Fenomenele sînt în

general mai simple în sol, în care materia organică depusă pe suprafața sa nu circulă nici pe verticală, nici pe orizontală decît în limite foarte restrînse. Procesul este mai complicat în mediul acvatic, în care substanțele organice tind să se sedimenteze, dispărînd din zona fotică sau de sub suprafață, pentru a trece în regiuni în care lumina este prea slabă pentru a asigura fotosinteza. Chiar în absența unui aport de nutrienți noi exogeni, microorganismele din coloana de apă continuă să se dezvolte, datorită procesului de regenerare a nutrienților realizat de alte categorii de microorganisme, care repun în circulație forme asimilabile de C, N, S, P etc. Curenții verticali ridică spre suprafață apele din adînc, adeseori bogate în substanțe asimilabile, iar turbulența de la suprafață indusă de acțiunea vîntului amestecă stratul superior oligotrof cu cel mai bogat în nutrienți provenit din adînc. Deși final cantitatea de elemente disponibile este relativ mică, datorită efectului de diluție, ea este suficientă pentru asigurarea persistenței multor specii de microorganisme.

În regiunile temperate, datorită ciclului de epuizare — regenerare a nutrienților, care se întinde de-a lungul întregului an, apar influențe distincte sezoniere (fig. 17).

**Răspunsul microorganismelor la condiții restrictive de nutriție** este de două tipuri:

1) Unele specii utilizează o perioadă limitată de timp constituenți de rezervă celulari prin metabolism endogen sau evoluează de la început spre stadii de latență (spori, chisti etc.) sau alte forme de supraviețuire. Ele pot rămîne în aceste forme perioade îndelungate pentru a-și relua creșterea odată cu un aport nou de nutrienți în mediu.

2) Cele mai multe specii continuă însă creșterea cu o viteză submaximală sau chiar minimală.

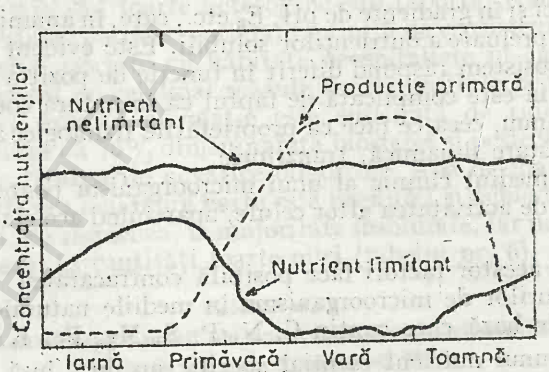



Fig. 17. — Relația dintre concentrația unui nutrient limitant și producția primară a unui lac cu apă dulce. Activitatea fotosintetizantă intensă din anumite luni este asociată cu scăderea concentrației nutrientului limitant și consecutiv cu scăderea formării de biomasă algală (după Sawyer, 1968).

Fenomenul a fost demonstrat experimental în condiții de chemostat, care au evidențiat capacitatea majorității bacteriilor, de a se acomoda rapid și ușor la condițiile limitării nutrienților. În acest cadru, ele cresc cu o rată de 10% sau chiar mai puțin din potențialul maxim (Tempest, Neijssel și Zaven-

boom, 1983). Această adaptare se face cu prețul unor modificări de comportament, între care cele mai importante sînt următoarele:

1) Sinteza unor cantități mari de proteine implicate în transportul intracelular al nutrientului limitant și/sau inducția sau derepresia unor mecanisme alternative cu eficiență mare în înglobare.

2) Modularea vitezei de înglobare și de metabolism a nutrienților nelimitanți (sau în exces), în special cînd aceștia funcționează ca sursă de C și energie.

3) Modularea coordonată a vitezelor sintezei tuturor componenților macromoleculari pentru a permite o creștere echilibrată, la o viteză submaximală.

4) Inducția unor căi metabolice alternative menite să ocolească limitările specifice ale creșterii.

## MICROORGANISMELE CA SURSĂ DE HRANĂ

Cantitatea de material celular produs de microorganisme, prin utilizarea substanțelor organice provenite din organismele moarte, are o deosebită importanță pentru fluxul de energie prin lanțul trofic detritic. Ea poate satisface total sau parțial nevoile de nutrienți ale multor nevertebrate.

În sol pot fi utilizate ca hrană practic toate grupele majore de microorganisme, ca, de exemplu, bacteriile chemoorganotrofe, levurile și mucegaiurile, microalgele și protozoarele.

În mediile acvatice, rolul major revine cianobacteriilor, algelor și, secundar, protozoarelor.

În funcție de natura nutrienților, organismele eucariote care se hrănesc cu microorganisme aparțin la două categorii.

1) **Organismele bacterivore** sînt reprezentate de amibe, ciliate, nanoflagelate nefotosintetizante (organisme cu dimensiuni între 2 și 20 μm), precum și de unele organisme mai evoluate, cum sînt copepodele și nematodele.

Bacteriile reprezintă o sursă deosebit de valoroasă de nutrienți datorită raportului mare N/C și P/C, conținutului lor în vitamine și aminoacizi, precum și capacității lor de refacere rapidă după ce au fost consumate. În anumite medii oligotrofe, cum sînt cele marine, bacteriile sînt prea rare și greu de capturat datorită dimensiunilor foarte mici ale formelor de supraviețuire (minibacterii, ultramicrobacterii) și animalele ar fi nevoite să cheltuiască mai multă energie pentru a le captura decît derivă din consumul lor. După Fenchel (1980), densitatea bacteriană necesară pentru a asigura prădarea eficientă de către ciliate este de 10—100 milioane celule/ml, condiție realizată numai în apropierea regiunilor estuarine și litorale. În plus, în aceste regiuni, bacteriile sînt absorbite pe diferite particule în suspensie, fiind mai accesibile animalelor bacterivore decît celor liber înotătoare. În largul mării, bacteriile pot fi preluate eficient numai de nanoflagelate.

În sol și în sedimentele acvatice, unde bacteriile se găsesc în număr foarte mare (de ~1 000 de ori mai numeroase decît în apele naturale), și, în plus, sînt legate de particule organice sau anorganice, ele sînt mult mai accesibile ca sursă de hrană (van Es, Laanbroek și Veldkamp, 1984).

După unele date, nematodele pot utiliza selectiv ~ 800 kg bacterii/ha/an.

2) **Organismele detritivore (detritofage)** se hrănesc cu particule de detritus rămas nemodificat în cursul trecerii prin căile digestive ale diferitelor animale. Pe această cale sînt preluate și bacteriile adsorbite sau incluse (și

frecvent multiplicate) în particulele de detritus. Prezența lor mărește în mod deosebit valoarea nutritivă a acestuia. Din categoria organismelor detritivore fac parte viermii (rîmele din sol și oligochetele acvatice), miriapodele, crustaceele, moluștele, acarienii etc.

Atlas și Bartha (1987) atrag atenția asupra unor particularități de nutriție cu microorganisme asociate particulelor de fecale eliminate de diferite animale în mediile acvatice și în sol. În cursul tranzitului intestinal, digestia hranei este, în general, incompletă, deoarece sînt digerate preferențial proteinele, glucidele și lipidele, iar produșii rezultați sînt absorbiți și utilizați în metabolismul animalelor respective. Materialele rezistente la degradare (celuloza, lignina etc.) rămîn intacte și sînt excretate în mediu, unde digestia lor continuă sub influența microorganismelor legate de structura lor sau proprii mediului respectiv. Dacă sînt reingerate de același animal sau de altele, ele suferă, în continuare, un proces de degradare care asigură conversia lor la forme mai digerabile și încorporarea lor în biomasa microorganismelor.

Atlas și Bartha (1987) citează și existența unor adaptări observate la unii reprezentanți ai meiofaunei* acvatice marine, care secretă mucus pe care îl depun pe diferite substraturi. Ele se deplasează lăsînd urme sub forma unor dîre ce acționează ca adevărate capcane pentru bacteriile, microfungii și microalgele din mediu. Ulterior, animalele revin și, urmînd dîra de mucus, consumă microorganismele capturate sau multiplicate în stratul de mucus.

Au fost descrise două mecanisme de preluare a hranei:

1) *Filtrarea* este întîlnită la nevertebratele de apă dulce și marină: cladocesi (apă dulce), copepode (apă dulce și marină), krill (marin), briozoare, crustacee sesile, viermi polichești, lamelibranhiate, branchiopode, tunicieri etc.

Reprezentînd o strategie avantajoasă din punct de vedere energetic pentru organisme animale mai mult sau mai puțin imobile, filtrarea este favorizată de existența unui flux de apă continuu, care conține hrana în suspensie, menținut prin agitarea cililor sau cu ajutorul unor organe modificate. Pe această cale sînt preluate din mediu bacterii, alge, protozoare, particule detritice și, în unele cazuri (bivalve și tunicieri), chiar virusuri (Atlas și Bartha, 1987).

2) „Fitotrofia" cel de-al doilea mecanism de hrănire cu microorganisme a fost descris la gasteropode acvatice și la echinoderme. El este favorizat de existența unor structuri adaptative (radula ** la melci).

Datorită acestor particularități, organismele respective nu se hrănesc cu microorganisme individuale, ci cu biomasă, adevărate culturi din biofilme, pelicule depuse pe suprafețe submerse, în care, datorită adeziunii și multiplicării, acestea ajung la densități foarte mari.

Microorganismele au un rol esențial în nutriția multor specii de insecte. Un caz tipic este cel reprezentat de unele termite și furnici care atacă lemnul, „însămînțînd" galeriile formate cu spori fungici. Se produc astfel adevărate culturi fungice care reprezintă hrana esențială a insectelor.

În sfîrșit, microorganismele simbiotice localizate în trofosomul viermilor vestimentiferi *(Riftia pachyptila)*, ce se dezvoltă în ecosistemele din jurul izbucurilor hidrotermale din adîncul oceanelor, reprezintă unica sursă de hrană a acestora.

---

* Meiofaună = animale bentonice mici, care trec printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, dar sînt reținute de una cu ochiuri de 0,1 mm.

** *Radula* - structură situată la nivelul faringelui care acționată de un grup de mușchi se comportă ca o răzătoare.

Porter (1976) a semnalat unele fenomene de selectivitate încă neexplicate: *Daphnia* sp. consumă și digeră foarte eficient alge din genul *Chlamydomonas*, nu însă și pe cele din genul *Sphaerocystis*, care, deși sînt ingerate, rezistă în intestin unde se multiplică intens. Fenomenele de selectivitate sînt și mai pronunțate în cazul unor organisme bacterivore din sedimente, care „recunosc" bacteriile, le ingeră (sute și mii de celule/oră), uneori chiar selectiv, la nivel de specie (van Es, Laanbroek și Veldkamp, 1984).

**Semnificație ecologică.** În anumite medii naturale, în special în cele acvatice, microorganismele reprezintă o sursă importantă de nutrienți. Astfel, algele reprezintă o sursă majoră de hrană pentru nevertebrate fitofage. Datorită acestui fapt, cele mai multe alge oceanice nu mor niciodată „de bătrînețe", ci prin consumarea lor de către animalele fitotrofe (Alexander, 1971).

Copepodele, cladocerii, crustaceele mici, precum și larvele multor ordine de metazoare consumă cantități imense de cianobacterii și de alge, producînd dispariția bruscă a „înfloririlor" algale. Marshall și Orr (1964) au demonstrat, că depunerea de ouă de către un copepod este direct corelată cu numărul celulelor de *Skeletonema* oferite ca hrană (fig. 18).

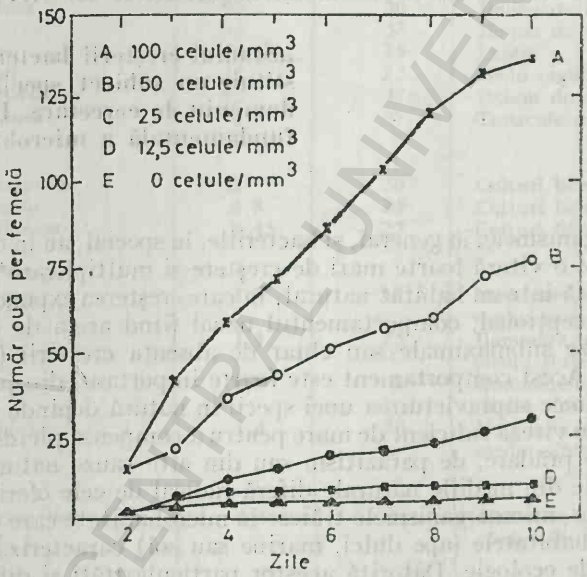



Fig. 18. — Influența concentrației celulelor de *Skeletonema* din alimentație asupra numărului de ouă depuse de femelele de copepode (după Marshall și Orr, 1964).

Nu există date cantitative certe cu privire la aceste procese în alte medii (în special la sol), dar este evident că hrănirea cu microorganisme afectează, în mare măsură, densitatea, compoziția și activitatea altor comunități biologice din sol.

Porter (1976), confirmat de Fenchel și Jorgensen (1977), a semnalat faptul, aparent paradoxal, că în mediile acvatice, în prezența fitofagilor, productivitatea primară și numărul anumitor specii de alge sînt mai mari decît în absența lor. Ei admit că zooplanctonul excretă o serie întreagă de nutrienți, stimulînd creșterea algelor, care supraviețuiesc. Efectului de regenerare rapidă

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a nutrienților limitanți de către prădător i se adaugă avantajele decurgînd din fragmentarea mecanică și amestecul particulelor de detritus cu bacteriile în cursul trecerii prin tractul intestinal. În unele cazuri a fost semnalată chiar apariția unor „înfloriri" produse de algele verzi cu teacă externă gelatinoasă, generate în cursul verii de suplimentul de nutrienți asigurat de fitofagi.

Sterner (1986) confirmă aceste date, demonstrînd experimental că viteza de multiplicare a diatomeelor și a unor cianobacterii (*Anabaena flos-aquae*, *Scenedesmus* etc.) este mai mică în absența crustaceului fitofag *Daphnia pulse* decît în prezența lui. Fitofagul asigură regenerarea N din mediu și exercită un efect stimulator indirect asupra dinamicii populației bacterio- și fitoplanctonice, efect care compensează mortalitatea produsă de fitotrofie.

Deși pe termen lung, zooplanctonul fitofag are, în general, un impact global negativ asupra populațiilor de alge, ideea că acest efect ar fi numai negativ este eronată. Regenerarea nutrienților de către fitofage reprezintă o verigă trofică importantă.

## CREȘTEREA MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ

**„Studiul creșterii bacteriilor nu constituie un subiect specializat sau un domeniu de cercetare. El este metoda fundamentală a microbiologiei"**

J. MONOD

Microorganismele, în general, și bacteriile, în special, au în condiții optime un potențial și o viteză foarte mari de creștere și multiplicare*. Situația este cu totul diferită într-un habitat natural, în care creșterea exponențială se realizează doar excepțional, comportamentul uzual fiind acela de creștere foarte lentă, la viteze submaximale sau chiar de absența creșterii (Kjellenberg și colab., 1987). Acest comportament este foarte important, din punct de vedere ecologic, deoarece supraviețuirea unei specii în natură depinde de capacitatea de a crește cu o viteză suficient de mare pentru a compensa pierderile provocate de moarte, de prădare, de parazitism sau din alte cauze naturale.

Condițiile din mediile naturale diferă radical de cele oferite de culturile *in vitro*. În plus, microorganismele trăiesc în microhabitate care pot diferi esențial de macrohabitatele (ape dulci, marine sau sol) caracterizate, în general, prin studiile de ecologie. Datorită acestor particularități și dificultăților tehnice specifice, creșterea microorganismelor în natură este foarte puțin cunoscută.

Cele mai multe studii sînt efectuate pe bacterii, datorită rolului lor major în lanțul trofic detritic. Ele au evidențiat diferențe foarte mari între valorile timpului de generație (TG) determinat *in vitro* și cele din natură. Astfel, *Escherichia coli* are *in vitro* un TG de 18—26 minute (respectiv 48—85 generații/zi), în timp ce în mediul eutrofic intestinal acesta este doar de două generații/zi. Acest fenomen s-ar datora condițiilor locale (alternanța dintre bogăția și deficitul periodic de nutrienți și mai ales fenomenelor de competiție (Koch, 1971). Aceeași diferență între viteza mare de creștere *in vitro* (tabelul nr. 7) și cea din natură se înregistrează și în cazul altor microorganisme. *Leu-*

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 325.

*Tabelul nr. 7*

**Viteza de creștere a principalelor grupuri de microorganisme exprimată ca număr de dublări/zi** (după datele lui Lilly și Barnett, 1951, Spector, 1956, Hoogenhoot și Amesz, 1965 și Brock, 1966)

| Organismele | Viteza de creștere | Temperatură (°C) | Condițiile |
|---|---|---|---|
| BACTERII FOTOSINTETIZANTE | | | |
| *Chloropseudomonas ethylicum* | 3,3 | 30 | Mediu sintetic |
| *Chromatium D* | 2,6 | 37 | Mediu sintetic |
| *Rhodopseudomonas spheroides* | 10,1 | 34 | Mediu sintetic |
| *Rhodospirillum rubrum* | 4,5—5,2 | 25 | Mediu sintetic |
| CIANOBACTERII | | | |
| *Anabaena cylindrica* | 0,96 | 25 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| *Anacystis nidulans* | 11,5 | 41 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| *Schizothrix calcicola* | 3,4 | 30 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| BACTERII HETEROTROFE | | | |
| *Bacillus megaterium* | 46 | 30 | Bulion de carne |
| *Escherichia coli* | 85 | 37 | Bulion de carne |
| *Lactobacillus casei* | 38 | 25 | Lapte |
| *Rhizobium meliloti* | 13 | 25 | Medii complexe |
| *Streptococcus hemolyticus* | 45 | 37 | Bulion de carne |
| *Treponema pallidum* | 0,7 | 37 | Testicule de iepure |
| FUNGI | | | |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 12 | 30 | Culturi lichide agitate |
| *Monilinia fructicola* | 0,8 | 25 | Culturi lichide agitate |
| *Basisporium gallarum* | 0,45 | 25 | Culturi lichide agitate |
| DIATOMEE | | | |
| *Asterionella formosa* | 1,9 | 18,5 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| *Navicula minima* | 1,4 | 25 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| *Phaeodactylum tricornutum* | 2,8 | 8 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| *Tabellaria flocculosa* | 1,4 | 20 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| ALGE ROȘII | | | |
| *Porphyridium aerugineum* | 1,4 | 21 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| EUGLENOIDE | | | |
| *Euglena gracilis* | 2,2 | 25 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| ALGE VERZI | | | |
| *Chlamydomonas reinhardtii* | 3,8 | 25 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| *Chlorella ellipsoidea* | 3,6 | 25 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| *Scenedesmus obliquus* | 2,2 | 25 | Iluminare optimă; mediu sintetic |
| PROTOZOARE | | | |
| *Didinium nasutum* | 3,6 | 21 | Prezența *Paramecium* sp. |
| *Paramecium caudatum* | 2,3 | 26 | Prezența bacteriilor |
| *Stentor coeruleus* | 0,6—0,9 | 19 | Prezența ciliatelor |

*cothrix mucor* are TG = 2 ore în culturi și 5—20 de ore în natură. Bacteriile marine se divid în laborator la 4—5 ore, iar în mediul natural la 210 ore. Cele mai multe bacterii heterotrofe izolate din sol se divid în culturi la 40—60 minute, iar în solul pădurilor de foioase, la 20 de zile (Matin, 1989).

## Aprecierea vitezei de creștere a microorganismelor în natură

Aceasta se face extrem de dificil. Pot și Brock (1970) au recomandat urmărirea dezvoltării microcoloniilor bacteriene pe lame de sticlă prin examinare la microscop sau microfotografie la) diferite intervale de timp (fig. 19.

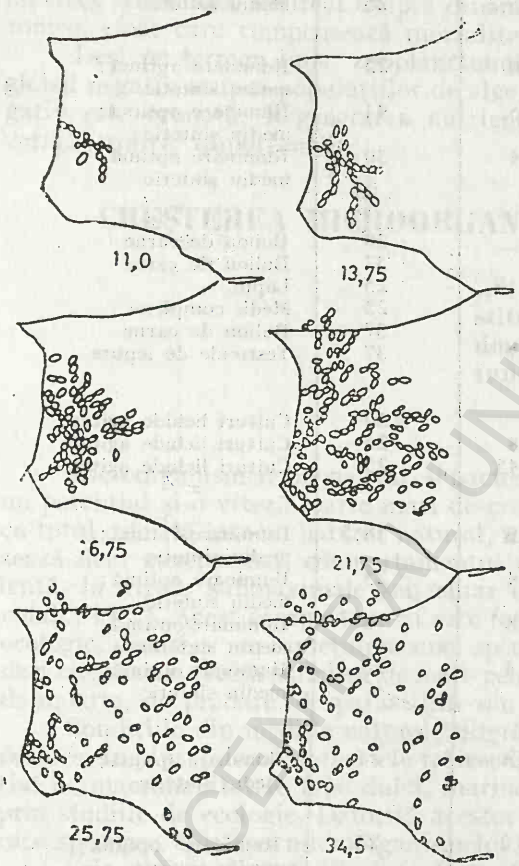



Fig. 19. — Stadiile succesive ale dezvoltării unei microcolonii pe o lamă de sticlă submersă într-o mică baltă. Reprezentare schematică după microfotografie (după Bett și Breck, 1970).

Fuhrman și Azam (1982) au demonstrat că încorporarea $^3$H-timidinei în moleculele de ADN reflectă destul de exact producerea de biomasă radioactivă bacteriană *in situ* dacă baza marcată este adăugată în concentrații mici (< 11 nM) și pentru o perioadă scurtă de timp.

Vitezele de creștere obținute în mediile acvatice vara în regiunile de coastă variază între 3 și 40 de ore. Aceste valori corespund, după Van Es, Laanbroek și Veldkamp (1984), unei viteze specifice de creștere ($\mu$) = 0,025—0,33 ore ($\mu$ = grame de biomasă nou formată pe oră).

Se consideră, în general, că pe lîngă stabilitatea moleculelor de ADN, viteza de încorporare a bazelor marcate radioactiv în ADN și ARN bacterian este un indicator util al vitezei de creștere, deoarece sinteza ADN este proporțională cu producerea de biomasă totală. În plus, cantitatea de ADN prezentă în celule este relativ constantă.

În aprecierea creșterii microorganismelor în natură trebuie ținut seama de faptul că volumul mediu al celulelor și greutatea uscată sînt influențate semnificativ de viteza de creștere specifică și de conținutul în nutrienți. Această particularitate demonstrată experimental este mai evidentă în cazul bacililor *(Bacillus megaterium, Klebsiella aerogenes, Salmonella typhimurium)* sau al cianobacteriilor filamentoase *(Oscillatoria agardhii)*. În cazul bacteriilor, cantitatea de ADN*,

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 58.

de ARN și de proteine per celulă crește progresiv cu viteza de creștere (Maaloe, 1960). În mediile bogate în nutrienți, microorganismele îi pot îngloba cu o viteză mai mare decît cea necesară nevoilor de bază ale celulelor (respectiv pentru asigurarea biosintezelor, producerii de energie și diferite activități ca mobilitatea etc.). În aceste cazuri, excedentul este depus sub formă de produși de rezervă energetică (glicogen, polifosfat, poli-β-hidroxibutirat etc.). În unele cazuri, aceștia sînt reprezentați de la cîteva procente din greutatea uscată a celulelor (spre exemplu, în cazul polifosfatului la *K. aerogenes)* pînă la 86% din greutatea uscată (în cel al poli-β-hidroxibutiratului la *Hydrogenomas eutropha)*.

Chiar în condiții optime de mediu, diferitele microorganisme cresc cu viteze diferite, determinate, în mare măsură, de particularități intrinsece, în mare parte controlate genetic.

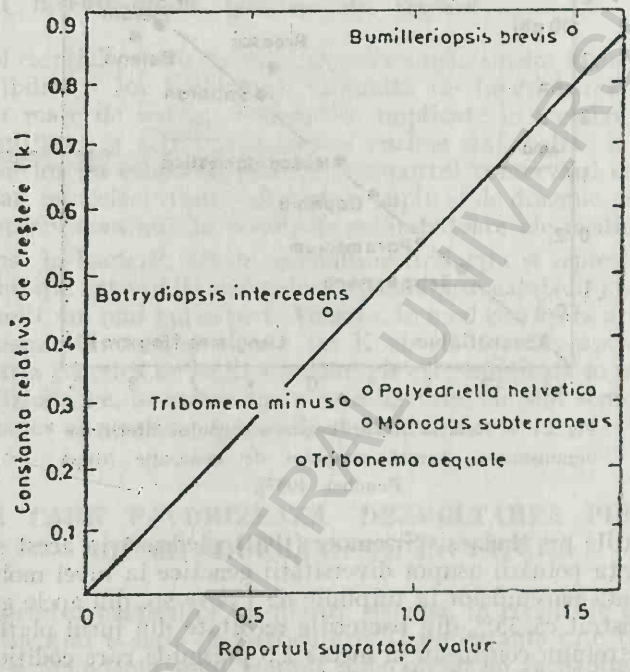



Fig. 20. — Relația dintre raportul suprafață/volum și viteza de creștere a șase alge, cultivate în condiții standard (după Fogg, 1965).

Fogg (1965), comparînd viteza de creștere a șase alge, în condiții standard de mediu, a stabilit o relație directă cu raportul suprafață/volum (fig. 20). El consideră că organismele cu dimensiuni foarte mici (raport suprafață/volum mare) ar prelua mai ușor și mai rapid nutrienții, prin difuzie, din mediu și ar elimina la fel de ușor diferiții produși de metabolism. Această relație ar putea explica viteza de creștere mare a bacteriilor ca grup. Ea nu explică însă, diferențele majore dintre unii membri ai acestuia.

Fenchel (1987) stabilește o corelație între lungimea corpului diferitelor organisme și durata timpului de generație (fig. 21). Tempest, Neijssel și Zeven-

boom (1983) atribuie un rol major, cel puțin în cazul bacteriilor, genomului acestora. Ei consideră că un genom mare ar fi incompatibil cu o viteză mare de creștere. Procariotele au, datorită dimensiunilor lor, un genom mic, deoarece nu pot purta mult ADN redundant. Ele au compensat această constrîngere recurgînd la informația genetică extracromosomală. Prezența temporară a plasmidelor în anumite celule ale unei specii, în condiții în care acestea sînt necesare, nu influențează în mod semnificativ mărimea celulei, genomul rămînînd suficient de mic pentru a fi adăpostit în interiorul acesteia și a fi replicat cu o viteză mare.

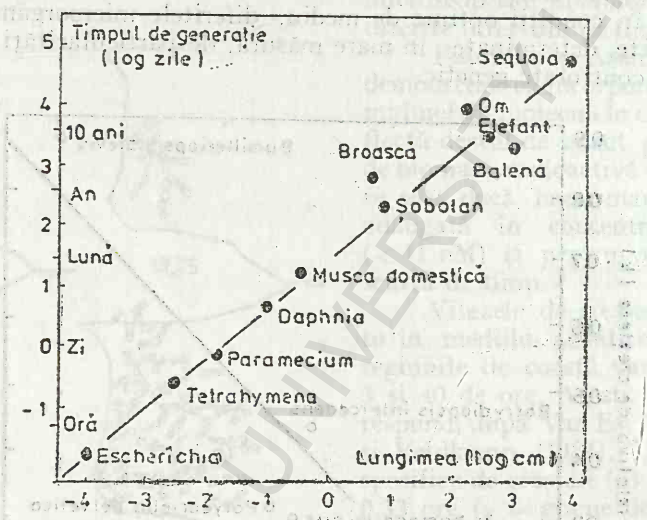



Fig. 21. — Relația dintre lungimea corpului diferitelor organisme și durata timpului de generație (după Fenchel, 1987).

Observațiile lui Hada și Sizemore (1981) pledează în acest sens. Ei au studiat influența poluării asupra diversității genetice la nivel molecular. Urmărind incidența plasmidelor la tulpinile de *Vibrio* sp. din apele golfului Mexic, au demonstrat că 35% din bacteriile recoltate din jurul platformelor de extracție a petrolului conțineau în medie 2,5 plasmide care codifică enzimele active în utilizarea hidrocarburilor. Prin contrast, numai 25% din tulpinile-martor recoltate din zone mai îndepărtate conțineau 1,5 plasmide per celulă. Concluzia este că poluarea și stresul de mediu, în general, pot mări incidența plasmidelor în comunitățile bacteriene, precum și numărul lor per celulă. Fenomenul este important mai ales datorită faptului că plasmidele sînt transferate relativ ușor intraspecific, interspecific, intergeneric și, după date mai recente, chiar între regnuri (între bacteria *Escherichia coli* și levuri). Existența și transferul lor reprezintă o strategie inedită de creare a unei rezerve de informație genetică „colectivă", care codifică activități și funcții solicitate în mod normal să intre în acțiune mai rar. Ea este utilizabilă mai degrabă de populațiile de bacterii decît de celulele individuale. Menținerea genomului esențial (cromosomal) al bacteriilor la dimensiuni minimale echivalează cu o

reducere a posibilităților de dezvoltare evolutivă, dependentă în mare măsură de materialul mutabil excedentar.

Aceste constrîngeri moleculare au influențat evoluția bacteriilor, care nu a mers în direcția cîtorva specii cu mare potențial de activitate generală, supercompetente („generaliste"), ci s-au dezvoltat divergent, în sensul răspîndirii informației genetice procariote între multe tipuri de celule specializate („specialiste"). Acestea se mențin în natură nu atît datorită capacității de competiție continuă cu alte specii din biosferă, ci, mai ales, datorită aptitudinii lor de a profita de modificările tranzitorii ocazionale ale mediului, care le sînt adecvate și de a se „agăța" de acestea în cursul perioadelor de adversitate (Tempest, Neijssel și Zevenboom, 1983).

### Rolul mecanismelor genetice de reglare

Un rol esențial pentru dezvoltarea microorganismelor în mediile naturale revine flexibilității lor fiziologice, asigurată de funcționarea coordonată a unui număr mare de sisteme enzimatice implicate în metabolismul celular. Natura, cantitatea și activitatea acestor enzime sînt reglate în așa fel, încît asigură celulelor un echilibru stabil sub raportul conservării caracterelor lor specifice, dar, în același timp, suficient de suplu și de dinamic pentru a le permite o adaptare continuă la condițiile schimbătoare ale mediului.

Descrise la bacterii, aceste mecanisme (inducția și represia sintezei enzimelor, inhibiția activității enzimelor, represia prin catabolit etc.)* au echivalente mai mult sau mai puțin perfecționate, în mod cert, și la alte categorii de microorganisme. Chiar dacă datele lui Koch (1976), care apreciază că 80% din informația genetică de la *Escherichia coli* este implicată în menținerea flexibilității fiziologice, ar putea apare ca exagerate, ele sînt semnificative pentru rolul major al acesteia în mediile naturale.

## FACTORII CARE FAVORIZEAZĂ DEZVOLTAREA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME ÎN NATURĂ

Comportarea bacteriilor în diferite sisteme, în condițiile culturilor continue, a evidențiat o serie de particularități importante care tind să explice distribuția și abundența unui anumit microorganism în habitatul său. Deși aceste date nu pot fi extrapolate ca atare la condițiile mediilor naturale, ele sugerează că microorganismele au dezvoltat, de-a lungul evoluției, o serie de adaptări menite să le favorizeze existența în condițiile frecvent improprii și adesea variabile ale mediului.

Bacteriile oligotrofe, spre exemplu, au dezvoltat pe lîngă o serie de adaptări morfologice (coci foarte mici, bacili fini, prezența unor apendice celulare), mecanisme eficiente de înglobare a nutrienților, împotriva gradientului de concentrație foarte marcat dintre mediu și celulă. Frecvent, același sistem de transport cu mare afinitate introduce în celulă substanțe diferite, care apoi urmează căi metabolice divergente. În unele cazuri, aceste mecanisme acțio-

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 513.

nează și în procesele de reglare a creșterii. La *Streptococcus* sp., serina, alanina și glicocolul sînt transportate în celulă de același sistem de transport. Cînd serina este prezentă în exces, se creează un deficit de glicocol care inhibă creșterea. Capacitatea de a utiliza selectiv anumite substanțe, evidentă cînd microorganismele întîlnesc în mediu doi nutrienți accesibili, este considerată ca importantă pentru succesul speciei în natură.

Ca regulă generală, sînt utilizați inițial nutrienții ce pot fi introduși ca atare sau mai ușor în diferitele căi metabolice și ulterior cei care trebuie prelucrați.

Prezența în mediu a unor substanțe organice blochează sinteza lor intracelulară prin procese subtile de reglare metabolică (inhibiția activității enzimelor, represie prin feedback etc.)* pînă cînd sînt consumate.

Studiile lui Jannasch (1967) referitoare la creșterea în condiții naturale au demonstrat că microorganismele dominante într-un anumit mediu sînt cele cu cea mai mare viteză de creștere în condițiile prevalente în mediul respectiv.

În condițiile mediului marin, *Spirillum* sp. se dezvoltă mai intens decît *Pseudomonas* sp., în primul rînd datorită faptului că dispune de mecanisme mai eficiente de înglobare a unor concentrații mici de C organic. În plus, tulpinile marine de *Spirillum* sînt obligat psihrofile, în timp ce cele de *Pseudomonas* sînt numai facultativ psihrofile (Harder și Veldkamp, 1971).

Alte exemple demonstrează caracterul general al acestei comportări. Astfel, *Lactobacillus casei* se dezvoltă mult mai bine în prezența unei surse limitante de C decît *Saccharomyces cerevisiae* (constanta de saturație K pentru glucoză este la bacterii de 200 de ori mai mică decît la levuri), (Megee și colab., 1972).

Smith și Kelly (1979) au studiat competiția dintre bacteriile chemolitotrofe obligate și facultative. În condiții care tind spre modul de nutriție complet chemolitotrof (tiosulfat și $CO_2$ ca sursă unică de C), bacteria *Thiobacillus neapolitanus* (chemolitotrof obligat) competiționează cu succes cu tulpina $A_2$ de *Thiobacillus* facultativ chemolitotrofă. Invers, în condiții de chemostat, în mediu cu acetat și tiosulfat, se observă frecvent situații care favorizează tulpinile facultativ chemolitotrofe și le elimină pe cele obligate. Acest fenomen, verificat și în cazul altor cupluri de bacterii, demonstrează că microorganismele facultativ chemolitotrofe, cu un metabolism mai versatil, sînt mai puțin bine adaptate la condiții extreme de mediu. Ele au însă un puternic avantaj selectiv în condiții fluctuante de mediu, care sînt numai rar favorabile celor riguros specializate în raport cu o anumită condiție.

În sfîrșit, un alt factor favorizant al dezvoltării microorganismelor în natură este reprezentat de capacitatea lor de a solubiliza substanțe, molecule complexe, frecvent inaccesibile altor sisteme biologice. Acest proces se poate realiza pe mai multe căi:

1) prin acțiunea enzimelor constitutive sau inductibile, care desfac legăturile chimice, eliberînd subunități solubile (ca în cazul celulozei, hemicelulozelor, lignînelor, pectinei, hidrocarburilor etc.);

2) prin acțiunea unor metaboliți eliberați în soluție (spre exemplu, acidul 2-ceto-3-deoxifosfogluconic, care dizolvă silicații);

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 520.

3) prin adsorbția puternică a microorganismelor de anumite substrate și utilizarea subunităților care trec „spontan" în soluție (ca în cazul unor bacterii ce aderă strîns de particulele de sulf, determinînd dizolvarea acestora fără medierea unor produși externi) (Brock, 1971).

## FACTORII CARE LIMITEAZĂ CREȘTEREA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME ÎN NATURĂ

Mărimea populațiilor de microorganisme rezultate din creștere și multiplicare depinde, pe de o parte, de natura și structura lor genetică și, pe de alta, de condițiile de mediu. Pe baza studiilor de laborator și a observațiilor în natură au fost incriminați mai mulți factori ca:

1) densitatea excesivă;
2) epuizarea unui nutrient esențial;
3) producerea de substanțe toxice;
4) variațiile dincolo de anumite limite ale unor factori de mediu (pH, $E_h$, iluminare, temperatură);
5) competiția intra- și mai ales interspecifică.

Rolul densității excesive printr-o multiplicare ce creează aglomerare fizică în mediu, considerat inițial ca important prin analogie cu unele situații din ecologia plantelor și animalelor, este considerat în prezent ca minor. Dovada o constituie dezvoltarea bacteriilor în colonii pe medii solidificate, în care densitatea și „ingrămădirea" depășesc cu mult densitățile observate în mediile lichide.

În schimb, epuizarea nutrienților sau a altor factori limitanți au în mod cert o importanță deosebită. Experimental, acest rol a fost demonstrat de Freter și Ozawa (1963), care au arătat că dezvoltarea *E. coli*, cultivată în saci de dializă, este limitată de epuizarea unui nutrient în condiții de anaerobioză sau de oxigen în condiții de aerobioză.

Pe baza acestui gen de observații, limitarea nutrițională este folosită în biotehnologie, în cazul culturilor în chemostat pentru a controla viteza de creștere și densitatea populațiilor de microorganisme. Fenomenul a fost semnalat și în condiții naturale de Lund (1950), precum și de Fogg (1965). Creșterea unei diatomee ca *Asterionella formosa* încetează și densitatea organismelor viabile scade cînd concentrația siliciului dizolvat (ca $SiO_2$) scade sub 0,5 mg/l (fig. 22). Studiile experimentale au confirmat aceste date, demonstrînd totodată că, în acest caz, nu este prezent alt factor limitant. Caracterul general al acestui fenomen a fost verificat în practică în diferite medii naturale pentru alți nutrienți, utilizați ca surse de N, P, C etc.

Rolul factorilor toxici este cunoscut din numeroase exemple. Astfel, în cursul fermentațiilor lactice, bacteriile producătoare încetează să se multiplice cînd concentrația acidului lactic atinge 1,5—1,7 g/l. Multiplicarea lor continuă dacă se ajustează condițiile de pH prin neutralizare sau dacă se utilizează medii cu mare putere-tampon. Un fenomen similar se observă și în cazul vinificației și al fermentației berii în care atingerea unei anumite concentrații-limită de alcool determină stoparea creșterii și a multiplicării levurilor.

În sfîrșit, un rol esențial în controlul și limitarea densității populațiilor de microorganisme revine diferitelor tipuri de interacțiuni competitive și,

în primul rînd, celor de prădare și parazitism, asociate culiza microorganismelor.

*Rolul limitant al factorilor de mediu* este ilustrat de o serie de observații.

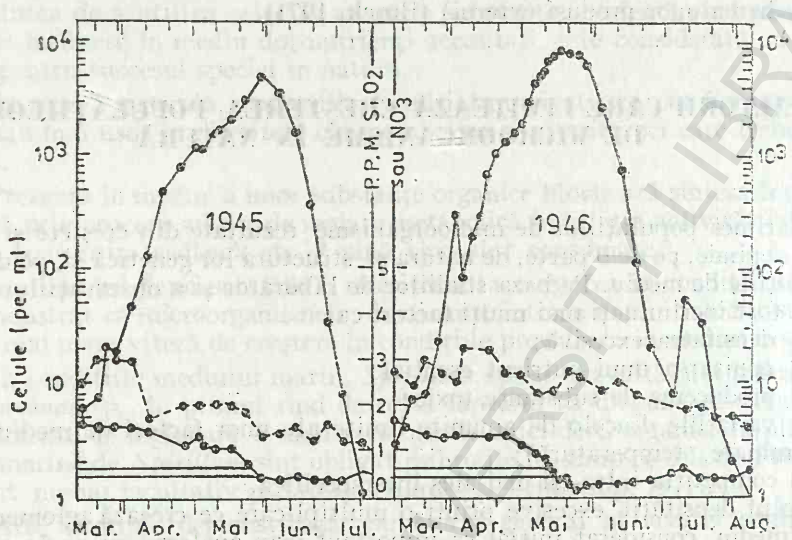



Fig. 22. — Variațiile densității celulelor vii de *Asterionella formosa*, înregistrate ca logaritmi, în funcție de timp, în anii 1945 și 1946, în Windermeret (bazinul de nord) (linia continuă). Linia întreruptă marchează valorile N ca nitrat (ppm), multiplicate de 10 ori pentru necesitățile reprezentării grafice. Zona cenușie corespunde siliciului dizolvat (în ppm), cu marcarea concentrației de 0,5 ppm (banda punctată). Ea corespunde concentrației $SiO_2$ la care creșterea încetează și numărul organismelor din populație începe să scadă (după Lund, 1950).

Gorlenko (1968) a descris influența gradientului de $E_h$ asupra distribuției bacteriilor sulfuroase purpurii *(Thiorhodaceae)*, în funcție de adîncime, în apa unui lac sărat. Datorită particularităților biologice, acestea se grupează formînd un strat, într-o zonă caracterizată printr-o valoare $E_h$ mică (potrivită caracterului lor anaerob), în care gradul de iluminare este corespunzător tipului lor de pigmenți fotosintetizanți) (fig. 23).

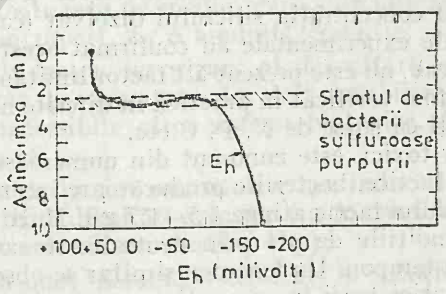



Fig. 23. — Distribuția bacteriilor sulfuroase purpurii în apele unui lac sărat, în funcție de modificările de $E_h$ corelate cu adîncimea (după Gorlenko, 1968).

Figura 24 evidențiază rolul limitant al acidității mediului și al temperaturilor mai ridicate asupra distribuției cianobacteriilor în mediile acvatice.

Natura factorilor limitanți care controlează distribuția și densitatea microorganismelor este diferită de la o specie la alta. Uneori, un singur factor limitant explică absența unei specii dintr-un anumit habitat. Generalizind, se poate spune că în mediile naturale prezența la nivel suboptimal a oricărui factor necesar dezvoltării normale a microorganismelor împiedică realizarea potențialului lor biologic în mediile respective.

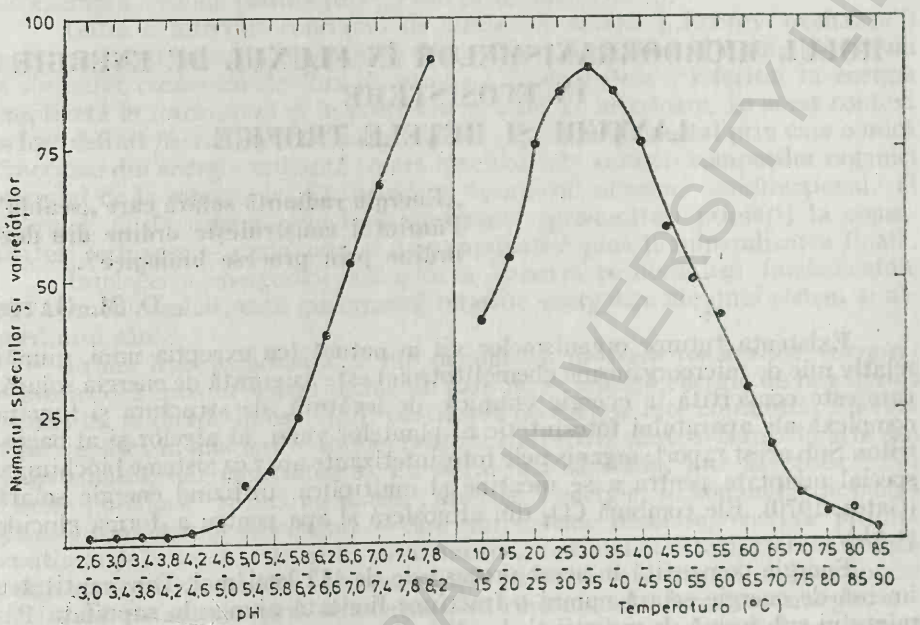



Fig. 24. — Dezvoltarea cianobacteriilor în funcție de reacția mediului (pH) și de temperatură (după Alexander, 1971).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FLUXUL DE ENERGIE ÎN ECOSISTEME LANȚURI ȘI REȚELE TROFICE

**„Energia radiantă solară care „scaldă" Pămîntul construiește ordine din dezordine prin procese biologice".**

D. M. GATES

Existența tuturor organismelor vii în natură (cu excepția unui număr relativ mic de microorganisme chemolitotrofe) este asigurată de energia solară, care este convertită în energie chimică, de legătură, de structura și funcția complexă ale aparatului fotosintetic al plantelor verzi, al algelor și al bacteriilor. Sub acest raport, organismele fotosintetizante apar ca sisteme biochimice special adaptate pentru a se menține și multiplica, utilizînd energie solară (Gates, 1970). Ele combină $CO_2$ din atmosferă și apa pentru a forma glucide și $O_2$).

Energia convertită în acest proces este de 112 kcal/mol. Din cantitatea imensă de energie solară numai o fracțiune limitată ajunge la suprafața Pămîntului sub formă de radiații și de căldură, cea mai mare parte fiind absorbită în straturile superioare ale atmosferei. Căldura, deosebit de importantă pentru organismele individuale, nu este transferată prin ecosistem. În schimb, diferitele organisme fotosintetizante utilizează energia radiantă luminoasă cu lungimi de undă corespunzătoare tipului de pigmenți cu care sînt dotate.

Asigurarea vieții necesită, pe lîngă energie solară, prezența, în diferite combinații, a elementelor biogene cu rol în nutriție. Acestea sînt circulate în natură, într-un proces care nu se sfîrșește niciodată, trecînd din organisme în natură și apoi la alte organisme.

## FLUXUL DE ENERGIE ÎN ECOSISTEME

Ideea determinării fluxului de energie, printr-un ecosistem aparține lui Lindeman (1942), iar fundamentarea teoretică a fost făcută de Gates (1962) și Odum (1968). Cantitatea de energie radiantă solară care ajunge la sol (sub formă de lumină directă sau filtrată) variază între valoarea maximă de 200—220 kcal/cm²/an în regiunile de deșert și 70 kcal/cm²/an în regiunile polare. Valorile estimate pentru regiunile europene variază între 80 și 120

kcal/cm²/an (Gates, 1970). Din aceasta, numai o fracțiune limitată este utilizată în fotosinteză, în primul rînd pentru că doar aproximativ 25% are o lungime de undă (λ), care stimulează fotosinteza.

În ansamblu, eficiența utilizării energiei solare în fotosinteză este foarte redusă, din energia care ajunge la suprafața Pămîntului utilizîndu-se mai puțin de 0,1% (Atlas și Bartha, 1985). Gates (1970) apreciază că un cîmp de porumb din regiunile temperate convertește ~1% (și numai rar 2%) din radiațiile incidente. Aceste valori sînt mult mai mici în cazul altor ecosisteme ca, de exemplu, cele de pădure (0,5%) sau de deșert (0,05%).

Gates a introdus conceptul de *schimb de energie* („Energy exchange") pentru a caracteriza interacțiunile fizice dintre organisme și mediu, iar Odum a formulat conceptul de *flux de energie* („Energy flow") referitor la energia implicată în fotosinteză și în procesele metabolice ulterioare. În acest context a fost definit *fluxul trofic de energie*, ca un proces fundamental prin care o mică fracțiune din energia radiantă solară face posibilă sinteza compușilor organici pornind de la anorganic. El include și transferul ulterior, unidirecțional, al energiei, de la organismele fotosintetizante (producători primari) la consumatori (erbivore — carnivore) și descompunători pînă la mineralizarea finală.

Înțelegerea energeticii ecologice se bazează pe două legi fundamentale ale termodinamicii, care guvernează relațiile energetice ale unui sistem și ale mediului său.

Prima lege (cunoscută și sub denumirea de *legea conservării energiei)* statuează că într-un sistem închis (în care nu se adaugă energie de la exterior și nici nu se pierde în exterior), cantitatea de energie este constantă. Energia poate apărea în mai multe forme, poate fi convertită dintr-o formă în alta sau redistribuită, dar cantitatea sa nu poate nici să scadă, nici să crească. Nu putem „produce" și nici nu putem „distruge" energie. În comunitățile biologice — respectiv în ecosisteme — care sînt sisteme deschise, energia primită continuu de la soare și disipată, de asemenea, continuu în sistem, trebuie obligatoriu cîștigată din mediu. În consecință, sistemul va continua să funcționeze atît timp cît soarele (prin fotosinteză) va continua să-i furnizeze energie.

Legea a doua *(principiul degradării energiei* sau *al entropiei)*, raportată la un sistem teoretic închis, preconizează o tendință spre o creștere a entropiei, adică spre o degradare a energiei la forme din ce în ce mai puțin utile. În cazul sistemelor deschise (al comunităților biologice), în acord cu această lege, ori de cîte ori energia este transformată dintr-o formă în alta există o scădere în cantitatea de energie utilă. Numai o cantitate mică din energia solară este capturată de plante și convertită în energie chimică de legătură. Un fenomen similar are loc în cazul transformării energiei chimice în alt tip de energie (mecanică etc.). Pentru a evita tendința de degradare prezisă de legea a doua a termodinamicii trebuie plătit „un preț", reprezentat de nevoia de energie externă pentru a putea menține ordinea, deși tendința continuă este spre dezordine.

Aplicate la o situație concretă, aceste principii sînt ilustrate astfel: în orice ecosistem există o primă scădere a energiei „utile" ori de cîte ori o plantă convertește energia solară în energie chimică de legătură, asociată cu substanțele organice din constituția țesuturilor vegetale nou formate. Ori de cîte ori un erbivor consumă o cantitate de plante, energia eliberată prin metabolizarea acestora este egală cu cantitatea de energie folosită pentru sinteza lor (legea I). În acest proces, o mare parte din energia dobîndită este pierdută sub formă de căldură și nu este utilă (legea a II-a). Dacă, la rîndul

său, animalul erbivor este consumat de un altul are loc o nouă scădere a energiei utile. Van Es și colab. (1984) apreciază că din energia primită ca hrană de organismele unei populații mai puțin de 50% este utilizată pentru construcția de celule și țesuturi noi, iar restul este pierdut prin respirație. În consecință, existența și funcționarea sistemelor deschise (cum este cazul ecosistemelor) este condiționată de aportul continuu al unor cantități noi de energie solară, care asigură menținerea fluxului de energie.

## LANȚURILE TROFICE

**„Bacteriile joacă un rol central în rețeaua trofică a comunităților biologice ca producători primari, consumatori primari și secundari, și ca descompunători. Fără participarea lor, ciclul trofic ar fi incomplet".**

E. H. EHRLICH

Ca și alte sisteme biologice, populațiile de microorganisme prezente în natură nu trăiesc izolate, ci în comunități, în general complexe, în cadrul cărora prezintă numeroase interacțiuni ce conferă caracterul dinamic al ecosistemelor.

Una dintre interrelațiile fundamentale este asociată cu transferul nutrienților și al energiei de la o categorie de organisme la alta, de-a lungul lanțului trofic. Transferul se realizează în trepte succesive, fiecare treaptă reprezentînd un nivel trofic.

Conceptul de *nivel trofic* („Trophic level") a fost formulat inițial de Thienemann (1926) pentru a caracteriza etapele succesive ale lanțului trofic și respectiv speciile de organisme avînd aceleași funcții trofice și aflate la același număr de trepte față de nivelul de bază.

Lanțul trofic („Food" sau „Trophic chain") este reprezentat de o secvență de organisme aflate în relații nutriționale („organisme care mănîncă și sînt mîncate"), situate pe nivele trofice succesive. Ele marchează modul în care se realizează transferul de substanțe și energie de la un nivel trofic la altul, în comunitatea biologică respectivă.

## TIPURILE DE LANȚURI TROFICE

Fără a contesta valoarea euristică a conceptelor fundamentale ale Ecologiei generale este evident că, în unele cazuri, ele nu pot fi puse în acord cu unele aspecte particulare ale activității microorganismelor în mediile naturale.

Încercările de cristalizare a unor concepte, deși reprezintă un progres din punctul de vedere al microbiologului sînt încă ambigue, marcate de unele inconsecvențe și de dezacorduri în tratarea acelorași fenomene. Aceste dificultăți sînt evidente și în tratarea unora dintre problemele următoare.

Într-o formă simplificată, Ehrlich (1985) descrie două tipuri de lanțuri trofice:

1) **Lanțul trofic asimilator**, care reunește organismele ale căror creștere și reproducere la fiecare nivel trofic sînt în dependență directă de cele aflate la nivelul trofic precedent.

El include producătorii primari, consumatorii primari și secundari ș.a.m.d.

2) **Lanțul trofic dezasimilator** este caracterizat prin descompunerea treptată a moleculelor organice complexe în molecule organice mai mici de către diferitele organisme la nivele trofice succesive. Rezultatul final poate fi dezasimilarea totală, cu producerea de molecule anorganice (mineralizare).

Acest lanț trofic include depolimerizatori, descompunători primari, descompunători secundari ș.a.m.d. Ei au un rol esențial în funcționarea rețelei trofice a ecosistemului, deoarece asigură un feedback de nutrienți, prin reducerea resturilor vegetale și animale în forme utilizabile de către producătorii primari.

Campbell (1977) descrie două tipuri de lanțuri trofice în raport cu modul de utilizare a substanțelor organice derivate din producția primară a ecosistemelor:

## LANȚUL TROFIC „FITOTROF"

*Lanțul trofic „filotrof"** („Grazing food chain") are un nivel de bază reprezentat de organismele fotosintetizante (plante verzi, alge și bacterii fototrofe), care utilizează sursa de nutrienți și energie ce intră în ecosistem, determinînd inițierea lanțului trofic. Aceste organisme — *producători primari* — sînt utilizate ca sursă de hrană și energie de consumatorii primari (plantele verzi de către erbivore, fitoplanctonul de zooplancton etc.). La rîndul lor, aceștia sînt consumați de consumatorii secundari, iar aceștia de către consumatorii terțiari ș.a.m.d. (fig. 25).

**Consumatorii** sînt organisme heterotrofe, care nu-și pot produce în mod autonom hrana și, ca urmare, obțin energia necesară pentru creștere și dezvoltare de la alte organisme vii sau din resturi vegetale și animale, produși de metabolism, excrete etc.

La modul general, heterotrofele consumatoare se comportă în funcție de tipul lor de nutriție și, în consecință, de funcțiile ecologice ca erbivore, carnivore, saprofite, parazite, prădătoare etc.

**Consumatorii primari sau de ordinul I** („Primary feeders" sau „Primary consumers") se hrănesc direct cu producătorii primari.

În mediile acvatice, ei sînt reprezentați de zooplancton, care consumă cea mai mare parte (90%) din fitoplancton. Restul de 10% este transferat

---

* Termenul „Fitotrof" este marcat prin ghilimele, deoarece aplicat lumii microorganismelor nu este riguros corect. El înlocuiește, în ansamblul lucrării, termenul „Grazing" din limba engleză, folosit cu semnificații mai mult sau mai puțin nuanțate. Enumerarea citorva dintre acestea sugerează dificultățile de adaptare la Ecologia microorganismelor a unor termeni creați pentru plante și animale: 1) *Grazing* = „procesul de hrănire cu plante (fitotrofia)" (Webster Dictionnary, 1972); 2) *Grazing* = „hrănire cu ierburi, alge sau fitoplancton, prin consumarea întregii plante sau, în primul caz, prin recoltarea întregii suprafețe de creștere" (Brock, 1974; Lincoln, Boxshall și Cox, 1982); 3) *Grazers* = „metazoare care se hrănesc cu alge și cianobacterii filamentoase" (Ehrlich, 1985); 4) *Lanțul trofic „grazing"* = lanțul trofic prin care „materialul vegetal formează sursa de hrană pentru erbivore, care, la rîndul lor, sînt consumate de carnivore. Împreună, acestea formează lanțul trofic „grazing" (Van Es, Laanbroek și Veldkamp, 1984); 5) *Grazing* = „Mod de hrănire propriu unor gasteropode și echinoderme cu adaptări pentru „raclarea" biofilmului de microorganisme de pe structurile submerse în mediul marin" (Campbell, 1987); *Grazing* = termen ce „indică faptul că cele mai multe organisme-pradă sînt producători primari" (Atlas și Bartha, 1987); *Grazing* = „consumul nediscriminat al populațiilor bacteriene de către protozoare-prădătoare (amibe, flagelate, ciliate)" (Atlas și Bartha, 1987; Veldkamp, 1987); *Lanțul trofic grazing* = „prima modalitate de utilizare a producției primare vii de către organismele heterotrofe" (Dawes, 1988).

în lanțul trofic detritic, fie ca material particulat, rezultat din descompunerea țesuturilor producătorilor primari morți, fie ca substanțe organice dizolvate, provenite din degradarea acestora sau a exsudatelor lor.

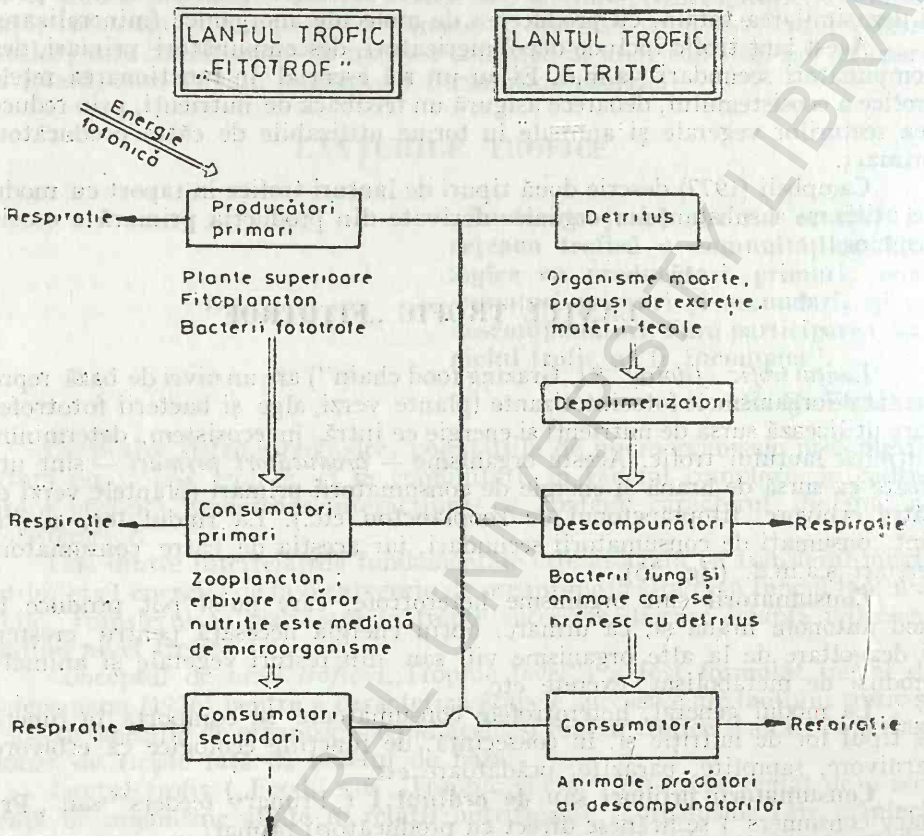



Fig. 25. — Lanțurile trofice. Interrelațiile dintre lanțul „fitotrof" și lanțul detritic (după Campbell, 1977).

În ecosistemele terestre, microorganismele nu sînt foarte importante nici ca producători primari și, în general, nici în calitate de consumatori în lanțul trofic „fitotrof". În citeva cazuri speciale, ele sînt implicate indirect în acest proces, prin faptul că au un rol esențial în utilizarea unei mari părți din producția primară în rumen sau în cecum-ul erbivorelor. În cazul microorganismelor există, de asemenea, o serie de situații în care interacțiunea producătorilor primari cu consumatorii primari este rezultatul unor forme mai sofisticate și mai integrate de asociere. Între acestea sînt de menționat simbiozele mutualiste dintre cianobacterii și alge (zoochlorele, zooxantele) cu protozoarele și metazoarele, simbioza cianobacteriilor sau a algelor cu fungii (licheni), precum și cazul fungilor care parazitează producătorii primari, preluîndu-le conținutul celular cu ajutorul haustorilor.

**Consumatorii secundari** sînt organisme carnivore care se hrănesc cu animale fitofage.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La fiecare nivel trofic, o parte din energia lanțului trofic este încorporată în structura organismelor respective, iar restul este pierdută sub formă de respirație.

Benton și Werner Jr. (1974) atribuie consumatorilor trei funcții ecologice majore:

1) utilizarea unei părți importante din energia stocată de producătorii primari (în special de plantele verzi în ecosistemele terestre și de alge în cele acvatice) în propria lor structură, cu pierderea unei părți sub formă de căldură;

2) transferul compușilor, ionilor și al elementelor biogene din structura organismelor fotosintetizante în propria lor protoplasmă și excreția unora din aceste substanțe, care final se reîntorc în formă minerală pentru a fi reutilizate de autotrofe;

3) funcție de reglare și control populațional.

## LANȚUL TROFIC DETRITIC

**„Porțiunea descompunătoare a rețelei trofice este dominată de microorganisme atît în mediul terestru, cît și în cel acvatic".**

R. M. Atlas
R. Bartha

Lanțul detritic* asigură utilizarea resturilor organice rezultate după moartea producătorilor primari, a consumatorilor primari și secundari, precum și a excretelor lor.

Cantitățile de materie organică sînt variabile în funcție de natura mediului (sol, ape dulci sau marine) și de condițiile locale și regionale.

Ele sînt cele mai bine cunoscute în cazul solului, în care s-a demonstrat dependența cantitativă de climat, de tipul de sol, de flora indigenă sau cultivată și de faună.

Burns și Martin (1986) citează următoarele date din literatura mai recentă:

1) Cantitatea de materie organică din litieră variază de la 10 kg N/ha/an în regiunile de tundră la 170 kg N/ha/an în pădurile tropicale de foioase (Staaf și Berg, 1981).

2) Exsudatele și descuamările radiculare produse în sol de culturile agricole pot contribui cu aproximativ 1 200 kg C/ha/an (în cazul rădăcinilor dintr-o cultură de grîu) (Jenkinson și Rayner, 1977).

3) Biomasa microorganismelor din sol reprezintă, în funcție de condițiile de mediu, 170—2 240 kg C/ha (Jenkinson și Ladd, 1981).

4) În comparație cu microorganismele, fauna are o contribuție minoră, respectiv aproximativ 100 kg C/ha.

* *Detritus* = (l. „de" + „terere" = a sfărîma), termen generic desemnînd toate tipurile de materiale de origine biologică (resturile organismelor moarte, produși de excreție etc. prezente sub formă fragmentară și aflate în diferite stadii de descompunere. În sensul cel mai larg, materie organică neanimată, sursă potențială de energie pentru speciile consumatoare detritofage (detritivore).

Deși aceste date oscilează în limite foarte largi, este cert că materia organică din sol reprezintă cel mai mare rezervor de C din natură, apreciat la $1,5—3 \times 10^{15}$ kg C (Degens, 1982). Ea prezintă sub raport calitativ o imensă diversitate, care reflectă și spectrul larg de enzime necesare organismelor detritofage pentru a le utiliza.

În cazul solului, materia organică detritică include compuși de proveniență vegetală (celuloză, hemiceluloze, lignine, pectine, amidon etc.), de origine animală (chitină, glicogen), glicoproteine structurale (colagen, chondroitinsulfați, acid hialuronic etc.), hormonale, de protecție (imunoglobuline), enzime etc. Componenții proveniți din microorganisme includ chitină, chitozan, peptidoglicani, lipopolizaharide, polizaharide extracelulare, fosfolipide, acizi teichoici etc.

Microorganismele, în particular bacteriile care conțin 15% N spre deosebire de țesuturile vegetale (2%), îmbogățesc solul în acest element, asigurînd un raport C/N avantajos pentru evoluția proceselor de degradare a compușilor organici.

În ansamblu, lanțul trofic detritic implică participarea a cel puțin trei categorii de microorganisme: 1) depolimerizatori; 2) descompunători și 3) consumatori (fig. 26).

Din punct de vedere biochimic, procesele de descompunere pot evolua în aerobioză (cu mineralizare eficientă și eliberare de compuși anorganici ai C,N,S,P etc.) sau în anaerobioză (prin procese fermentative), cu producerea de compuși finali cu structură mai simplă, rezultați din degradarea incompletă a detritusului. În general, cu cît mediul este mai anaerob ierarhia tipică a descompunătorilor este mai complexă (include mai multe nivele trofice), întrucît mineralizarea completă necesită intervenția mai multor specii de microorganisme care acționează succesiv. În schimb, în aerobioză, frecvent, este suficient un singur nivel trofic (Ehrlich, 1985).

Complexitatea ierarhiei trofice depinde și de natura, ca și de concentrația materiei organice.

**Depolimerizatorii** sînt microorganisme a căror acțiune se realizează prin intermediul enzimelor extracelulare, ce determină hidroliza polimerilor biogeni. Unii dintre aceștia (celuloza, ligninele, hemicelulozele, chitina etc.) sînt deosebit de rezistenți. Rolul de depolimerizatori revine, în funcție de natura produselor respective, bacteriilor și microfungilor.

**Descompunătorii** sînt microorganisme care preiau substanțele rezultate din acțiunea depolimerizatorilor, a consumatorilor primari sau secundari din lanțul trofic „fitotrof" sau chiar a producătorilor primari. În unele cazuri, depolimerizarea și descompunerea pot fi realizate de aceleași microorganisme, dar activitățile respective specifice se desfășoară la nivele trofice diferite.

În funcție de natura substanțelor organice, descompunerea poate avea loc, uneori, în mai multe etape, sub acțiunea unor microorganisme diferite.

Descompunătorii degradează substanțele organice provenite din organismele vegetale sau animale, sau din microorganisme, eliminînd după mineralizare, elementele în sol pentru a fi refolosite de plante.

Activitatea lor este favorizată de o serie de organisme animale (larve și adulți ai insectelor, nematode etc.), care mărunțesc materialele detritice, expunînd suprafețe noi și mari atacului enzimelor microbiene.

Lanțul trofic detritic este interconectat cu cel „fitotrof" (fig. 25). În consecință, el poate fi declanșat de oricare din nivelele lanțului „fitortrof"

(producători primari, consumatori primari sau secundari), deoarece o parte din constituenții acestora (organisme moarte, excreții, secreții etc.) poate fi preluată și utilizată de depolimerizatori, descompunători și consumatori din lanțul detritic.

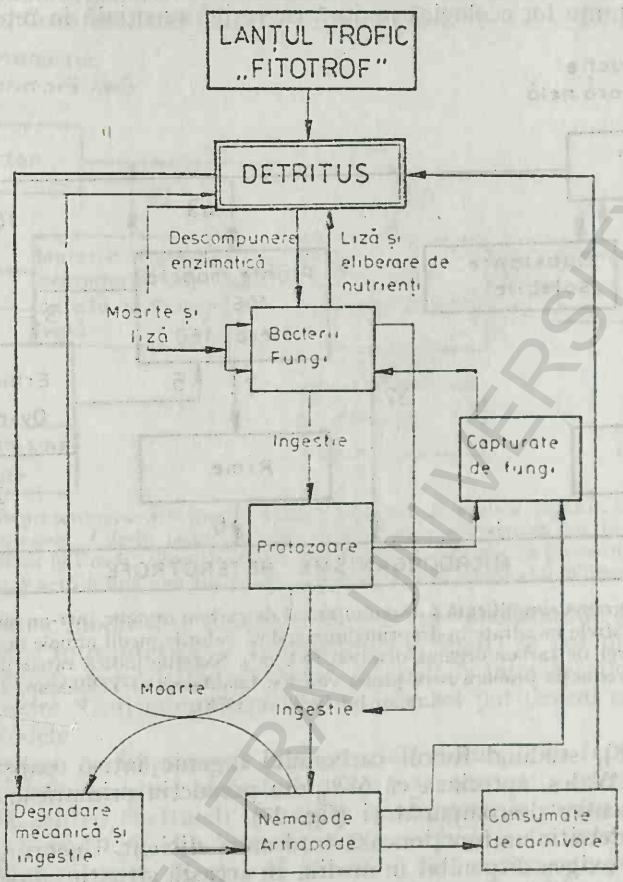



Fig. 26. — Reprezentarea schematică a rețelei trofice detritice, evidențiind interrelațiile dintre organismele prin care sînt recirculate substanțele în mediu (modificat după Campbell, 1977).

Spre deosebire de lanțul trofic asimilator, prin care cea mai mare parte din energie este stocată în structura organismelor, în cazul lanțului detritic, cea mai mare parte este stocată în mediul ambiant. Cu toate acestea, rețeaua trofică detritică este intrinsec legată de producția secundară, deoarece o parte semnificativă din biomasa microbiană formată în cursul descompunerii este reciclată în rețeaua trofică. Bacteriile care înoată liber sau sînt atașate de detritus utilizează activ o gamă largă de substanțe dizolvate sau particulate și produc biomasă, care poate reprezenta în mediul marin o sursă principală sau adițională de carbon și factori de creștere.



BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După Campbell (1977), în unele ecosisteme acvatice, biomasa descompunătorilor reprezintă numai 0,6% din cea a producătorilor primari per m². Cu toate acestea, 25% din fondul de energie provenit de la producătorii primari trece prin descompunători în ecosistemele respective. Aceste date demonstrează viteza mare de metabolism a descompunătorilor și, în consecință, importanța lor ecologică majoră ca verigă esențială în rețeaua trofică.

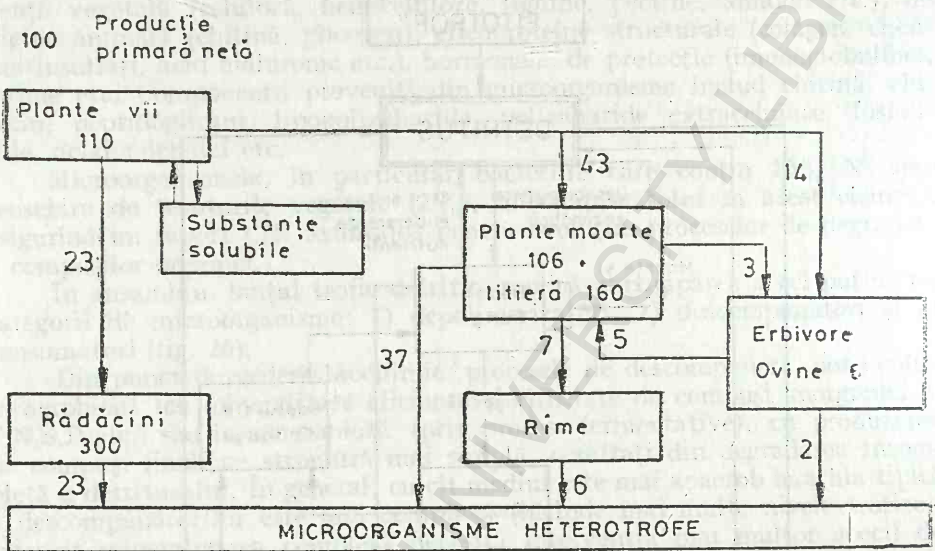



Fig. 27. — Diagramă simplificată a fluxului anual de carbon organic într-un sistem de pajiște montană. Cifrele încadrate în dreptunghiuri indică valorile medii anuale de biomasă sau mărimea rezervei de carbon organic dizolvat (g C/m²). Săgețile indică ratele de transfer ca procente din producția primară netă (după van Es, Laanbrock și Veldkamp, 1984, pe baza datelor lui Perkins, 1978).

Perkins (1978), studiind fluxul carbonului organic într-o pajiște montană din regiunea Wales, apreciază că 68% din producția primară anuală devine disponibilă pentru descompunători (fig. 27).

Lanțul detritic nu funcționează totdeauna eficient. Uneori, el epuizează cantitatea de oxigen disponibil în mediu. În această situație, procesele degradative sînt incomplete (producere de materie organică parțial descompusă, alcooli, amine, metan, $H_2S$ etc.). Conexiunile sale cu lanțul „fitotrof" sînt reduse sau rupte, cu efecte negative profunde asupra organismelor din ecosistem (Woodwell, 1970).

Cele două lanțuri trofice fundamentale („fitotrof" și detritic) sînt strîns interrelate (fig. 28).

Participarea lor în fluxul de energie este diferită în funcție de natura habitatelor. Astfel, în mediul marin, după date mai recente, cantitatea de materie organică dirijată pe lanțul trofic „fitotrof" este mult mai mică decît s-a crezut inițial. Williams (1981), precum și Fuhrman și Azam (1982) au demonstrat că aproximativ jumătate din producția primară fitoplanctonică intră în lanțul trofic detritic. O mare parte din aceste substanțe este disponibilă direct ca exsudate algale sau produse ale lizei algelor care se descompun (30% în fig. 28) sau după moartea organismelor fitotrofe din sedimente (10%) (van Es,

Laanbroek și Veldkamp, 1984). În cazul pădurilor, numai 17—20% intră în lanțul „fitotrof" și 80—83% în cel al descompunătorilor (Pomeroy, 1980, 1984).

Poziția microorganismelor în raport cu diferitele nivele trofice nu este fixă. Unele microorganisme sînt polifuncționale, putînd acționa la mai multe nivele trofice. Ceva mai mult, uneori deplasarea de la un nivel trofic la altul

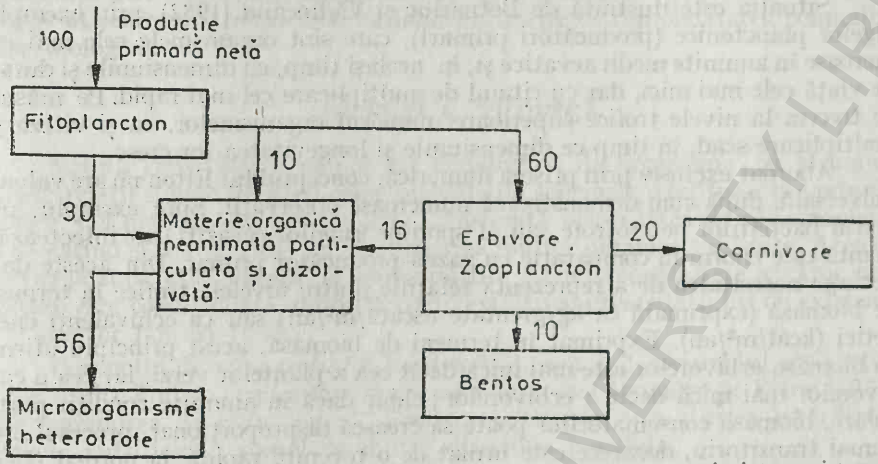



Fig. 28. — Reprezentarea schematică a fluxului anual de carbon organic, într-un sistem planctonic oceanic. Cifrele indică valorile medii anuale de biomasă sau de rezervă de C organic dizolvat (g C/m²). Săgețile indică cantitățile transferate ca procente din producția primară netă (după van Es și colab., 1984, pe baza datelor lui Williams, 1981).

poate determina modificări fundamentale ale metabolismului. Astfel, unele microorganisme fotosintetizante (producători primari) se pot dezvolta la întuneric ca heterotrofe (utilizînd substanțe organice neanimate), devenind astfel descompunătoare. Unii microfungi saprofiți din sol pot deveni carnivori dacă atacă nematodele.

Un fenomen cu importanță fundamentală decurge din faptul că la fiecare transfer de la un nivel trofic la altul, o mare parte din energia potențială este pierdută pentru cheltuieli energetice și disipată în mediu. Se apreciază că, în general, 10—15% din biomasa fiecărui nivel trofic este transferată la nivelul imediat superior. Restul de 85—90% sînt consumate prin respirație sau intră în porțiunea descompunătoare a rețelei trofice. Din aceasta decurge faptul că reprezentarea grafică a producției unui ecosistem are forma unei piramide, în care fiecare nivel succesiv de populație primește doar 10% din energia transferată de la nivelul inferior lui. Evident că aceste proporții nu sînt fixe. În funcție de condițiile locale au fost semnalate valori mai mici sau mai mari. Ca regulă generală însă, cu cît un nivel trofic este mai sus situat (respectiv mai îndepărtat de nivelul de bază) cu atît biomasa lui este mai mică.

## RELAȚIILE DINTRE NIVELELE TROFICE

### Piramida numerelor

Elton (1927) a propus o reprezentare diagramatică a relațiilor trofice dintr-o comunitate, menită să evidențieze un fapt de observație, bazat inițial

pe considerente numerice: la fiecare nivel trofic, numărul indivizilor este mai mic decît la nivelul precedent. De aici, denumirea de *piramidă a numerelor (piramidă trofică* sau *eltoniană)* dată acestei reprezentări, în care fiecare nivel trofic este reprezentat sub forma unui domeniu orizontal al piramidei. Producătorii primari formează baza piramidei, iar consumatorii, nivelele trofice succesive.

Situația este ilustrată de Botnariuc și Vădineanu (1982) prin exemplul algelor planctonice (producători primari), care sînt organismele cele mai numeroase în anumite medii acvatice și, în același timp, cu dimensiunile și durata de viață cele mai mici, dar cu ritmul de multiplicare cel mai rapid. Pe măsură ce trecem la nivele trofice superioare, numărul organismelor, ca și viteza de multiplicare scad, în timp ce dimensiunile și longevitatea lor cresc.

Abordat exclusiv prin prisma numerică, conceptul lui Elton nu are valoare universală, după cum demonstrează numeroase observații. Spre exemplu, numărul bacteriilor heterotrofe sau al sporilor fungilor paraziți care infectează o plantă este enorm în comparație cu gazda-producător primar. Din aceste date decurge necesitatea de a reprezenta relațiile dintre nivelele trofice în termeni de biomasă (exprimată ca kg/greutate uscată/$m^2$/an) sau ca echivalenți energetici (kcal/$m^2$/an). Exprimat în termeni de biomasă, acest principiu afirmă că biomasa erbivorelor este mai mică decît cea a plantelor verzi, iar cea a carnivorelor mai mică decît a erbivorelor; chiar dacă în anumite condiții particulare, biomasa consumatorilor poate să crească disproporționat, procesul este numai tranzitoriu, deoarece este urmat de o revenire rapidă la normal (Benton și Werner jr., 1974). Fig. 29 A ilustrează acest concept. În realitate, scăderea biomasei de la un nivel la altul este mult mai bruscă, reprezentarea cea mai aproape de situațiile concrete din ecosistemele naturale fiind aceea din figura 29 B.

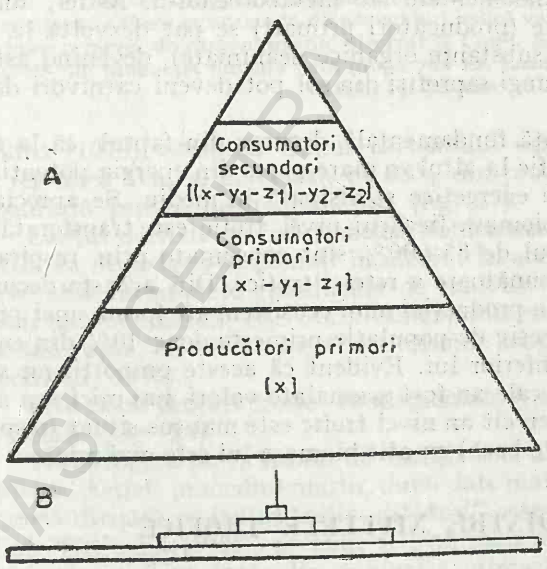



Fig. 29. — Piramida numerelor (trofică). Reprezentare diagramatică a nivelelor trofice succesive. x = energia totală disponibilă biologic la nivelul producătorilor primari; $y_1$ = partea din energie disponibilă în x consumată de producătorii primari pentru asimilare în reacțiile endergonice; $z_1$ = partea din energia disponibilă în x pierdută sub formă de căldură de producătorii primari în reacții exergonice; $y_2$ = energia disponibilă în $(x - y_1 - z_1)$ consumată de consumatorii secundari pentru asimilare; $z_2$ = partea din energia disponibilă biologic în $(x - y_1 - z_1)$ pierdută sub formă de căldură de consumatorii secundari în reacții exergonice.
Jos — structura reală a piramidei evidențiind diminuarea netă a biomasei de la un nivel la altul (după Benton și Werner Jr., 1974).

În concepția clasică, fenomenul descris sub denumirea de piramidă numerică ar fi consecința limitărilor de energie: la fiecare nivel trofic succesiv, energia biologic disponibilă este mai mică decît la nivelul inferior (precedent),

ceea ce face ca numărul (biomasa) indivizilor care pot fi hrăniți să fie progresiv mai mic în raport cu nivelul de bază.

Unii cercetători consideră, totuși, că rolul principal în determinismul acestui fenomen ar reveni dinamicii populației și nu energeticii ecologice.

Ehrlich (1985) admite că este posibil ca piramida „numerelor" să fie consecința atît a limitării energetice, cît și a dinamicii populației, însă rolul relativ al celor doi factori ar fi variabil în funcție de complexitatea comunităților biologice.

## REȚEAUA TROFICĂ

Natura construiește numai rar comunități de organisme cu structuri și interrelații simple de tipul celor sugerate de schemele referitoare la lanțurile trofice. Cel mai adesea, energia este transferată într-o rețea de căi complexe, ce se extind și se ramifică, cu participarea multor organisme diferite. Această particularitate este proprie și comunităților de microorganisme a căror dezvoltare este condiționată, datorită complexității și diversității lor de existența mai multor lanțuri trofice.

Conceptul de *rețea trofică* („Food web"), reunind ansamblul interacțiunilor trofice dintr-o comunitate sau ecosistem, a fost formulat de Elton (1927), sub denumirea de *ciclu trofic* („Food cycle"), pentru a ilustra interdependențele nutriționale complexe dintre diferitele populații.

El are la bază observația că interacțiunile trofice nu reprezintă o simplă înlănțuire liniară de la nivelul trofic de bază spre cele superioare, ci o rețea complicată, în care, spre exemplu, un organism aflat pe o anumită treaptă inferioară în ierarhia nivelelor trofice poate deveni sursă de hrană pentru mai multe tipuri de organisme la nivelul trofic următor.

Figura 30, reprezentînd un model propus de Ehrlich (1985), ilustrează acest punct de vedere, demonstrînd că fluxul nutrienților nu este totdeauna unidirecțional: consumatorii primari sau secundari pot hrăni producătorii primari cu substanțele organice sintetizate de ei după ce, în prealabil, acestea au fost mineralizate prin acțiunea descompunătorilor primari și/sau secundari. Este evident că, în general, aceste reprezentări grafice reflectă numai parțial realitățile dintr-un ecosistem, deoarece ansamblul relațiilor trofice și al conexiunilor existente sînt foarte greu de stabilit. Cu toate acestea, conceptul de rețea trofică și reprezentările sale grafice au o importanță deosebită în ecolo-

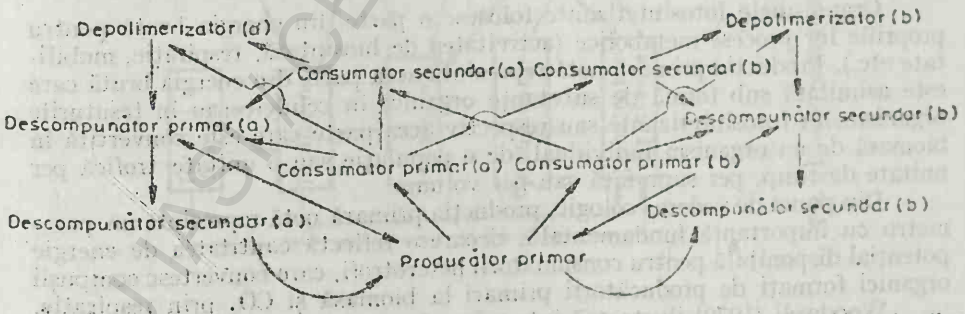



Fig. 30. — Reprezentarea grafică a unei rețele trofice, evidențiind fluxul posibil al nutrienților într-un sistem ipotetic (după Ehrlich, 1985).

gie. Deși lacunare și limitate în ceea ce privește relațiile energetice cantitative, ele evidențiază relațiile majore din ecosistem sub raport calitativ.

Conceptul de rețea trofică demonstrează că asocierea diferitelor populații de organisme dintr-un habitat nu este întîmplătoare. Bacteriile, microalgele, protozoarele și ocazional diferite nevertebrate (copepode, cladoceri, nematode, turbelariate etc.) sînt membrii unei rețele trofice pentru că fiecare „hrănește" unul sau mai multe organisme din asociație, cu secrețiile, excrețiile sau cu ceea ce rămîne în mediu după moartea lor.

Cu cît comunitatea este mai matură cu atît structura ei este mai diversă și rețeaua trofică mai complicată, în așa fel încît într-un ecosistem natural rețeaua poate fi constituită din sute de căi (Woodwell, 1967, 1970).

Deși prezintă interrelațiile trofice dintre microorganismele, plantele și animalele unui anumit ecosistem de stepă în cursul utilizării substratelor prezente figura 31 este sugestivă pentru complexitatea lor în ansamblu.

## PRODUCȚIE ȘI PRODUCTIVITATE

Cu excepția unui număr mic de microorganisme chemosintetizante, existența rețelei complexe de sisteme biologice din natură este asigurată de energia solară, convertită, prin activitatea complexă a organismelor fotosintetizante și, în primul rînd, a plantelor verzi, în energie chimică. Asigurarea vieții este condiționată, pe lîngă fluxul de energie solară, de prezența absolut obligatorie, în combinații adecvate, a elementelor biogene, care trec într-un proces, practic fără sfîrșit, din natură în organisme și din nou în natură. Energia acumulată de organismele fotosintetizante sub formă de substanță organică formează *producția primară*.

### Producția primară brută sau globală („Gross production")

Corespunde întregii cantități de energie luminoasă solară convertită de organismele fotosintetizante individuale, de o populație sau de o unitate trofică, în energie chimică de legătură, în compuși organici.

Producția primară brută este raportată la unitatea de timp și de suprafață sau de volum.

### Producția primară netă

Organismele fotosintetizante folosesc o parte din energia brută pentru propriile lor procese metabolice (activitatea de biosinteză, respirație, mobilitate etc.). Producția primară netă reprezintă acea parte din energia brută care este asimilată sub formă de substanțe organice în celulele sau în țesuturile organismelor fotosintetizante sau respectiv acea parte care este convertită în biomasă de un organism individual, de o populație sau o unitate trofică per unitate de timp, per suprafață sau per volum.

Din punct de vedere ecologic, producția primară netă reprezintă un parametru cu importanță fundamentală, deoarece reflectă cantitatea de energie potențial disponibilă pentru consumatorii heterotrofi, care convertesc compușii organici formați de producătorii primari la biomasă și $CO_2$ prin respirație.

Woodwell (1970) ilustrează într-o formă simplificată conceptele de producție globală și producție netă.

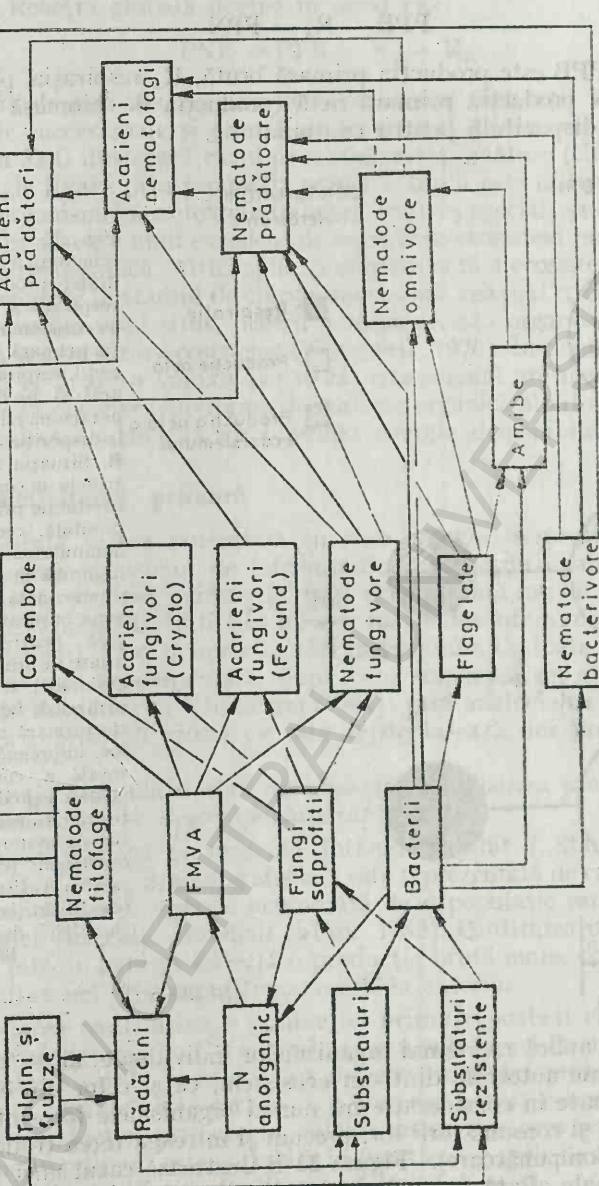



Fig. 31. — Reprezentarea grafică a interacțiunilor trofice dintre microorganisme, plante, faună și substrate într-un ecosistem de stepă (după Hunt, 1985).

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

În cazul unei plante unice (fig. 32 A), o parte din producția primară brută (energia totală fixată) este utilizată pentru respirația plantei, după reacția:

$$PPB - R_A \rightarrow PPN$$

în care: PPB este producția primară brută, $R_A$ respirația plantei (autotrofe), iar PPN producția primară netă (producția de biomasă celulară sau tisulară nouă, disponibilă pentru consumatori).

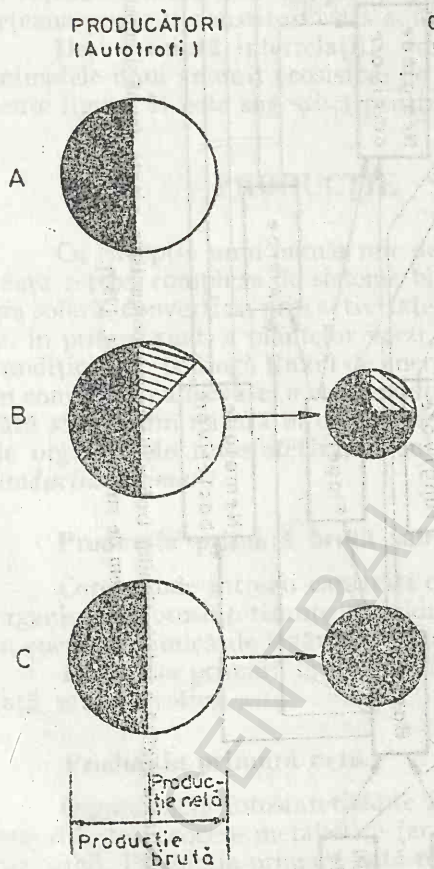



Fig. 32. — Reprezentarea schematică a raportului dintre producția primară, respirație și producția netă a ecosistemului. **A.** Producția primară brută (întregul cerc), respirația (zona neagră) și producția primară netă(zona albă), care rămîne la dispoziția consumatorilor. **B.** Situația în care heterotrofele nu consumă întreaga producție primară netă disponibilă, ceea ce duce la acumularea de substanță organică în ecosistem (producție netă în ecosistem, zona hașurată), (situație tipică pentru ecosistemele aflate în primele stadii succesionale). **C.** Consumatorii utilizează întreaga producție primară netă. Acțiunea lor, împreună cu respirația totală a comunității sînt egale cu producția primară brută. Nu are loc acumularea de materie organică în ecosistem (situație tipică pentru ecosistemele climax) (modificat de Atlas și Bartha, 1987. după Woodwell, 1970).

Reacția se aplică nu numai organismelor individuale, ci și comunităților de organisme autotrofe dintr-un ecosistem, ca și celor din ecosferă. În acest caz sînt luate în considerație nu numai organismele fotosintetizante și respirația lor, ci și consumatorii lor, precum și întreaga rețea trofică (inclusiv organismele descompunătoare). Figura 32 B ilustrează cazul unei comunități vegetale și animale aflată în stadiul succesiunilor timpurii. În această fază, organismele heterotrofe nu consumă întreaga producție primară netă disponibilă, deoarece respirația totală $R_A + R_H$ este mai mică decît producția primară brută. Ca urmare, o parte din producția netă (energia disponibilă) este utilizată pentru creștere și încorporată în structura heterotrofelor, contribuind

la producția netă a ecosistemului (PNE). Restul este preluat de consumatori, care utilizează cea mai mare parte pentru propria lor respirație ($R_H$), stocînd o mică parte din ea pentru creștere, pe care o adaugă la producția netă a ecosistemului. Reacția globală devine în acest caz:

$$PNE = PPB - R_A + R_H$$

Relația de mai sus permite stabilirea unor distincții importante între comunitățile succesionale și cele aflate în stadiul de climax.

Figura 32 C ilustrează cazul unei comunități mature (climax) în care întreaga energie fixată prin producția primară brută este utilizată în respirația asociată a organismelor autotrofe (plante verzi în special) și heterotrofe (consumatori). În absența unui excedent de energie în ecosistem nu are loc acumulare de materie organică. Altfel spus, producția netă a ecosistemului tinde spre zero. Ecosistemele în stadiul de climax furnizează cea mai eficientă cale de utilizare a resurselor unui situs, pentru a susține viața organismelor, cu un impact minim asupra altor ecosisteme (Woodwell, 1970). În cazul în care producția primară netă are o valoare negativă, ecosistemul are nevoie de un aport energetic de la exterior, sub formă de materie organică alohtonă. În lipsa acestuia, comunitatea biologică va consuma energia disponibilă și va dispărea.

### Productivitatea primară

Reprezintă viteza potențială cu care energia, respectiv biomasa, sînt stocate în urma proceselor de fotosinteză de către un organism, o populație sau o unitate trofică per unitate de timp, de suprafață sau de volum. Termenii de producție și productivitate sînt folosiți foarte des într-o accepțiune ambiguă sau ca echivalenți chiar în unele lucrări importante. Cu toate acestea, deosebirea dintre ei este fundamentală, după cum sugerează un exemplu sugestiv, prezentat de Botnariuc și Vădineanu (1982): prin analogie cu un vehicul, productivitatea reprezintă viteza cu care se deplasează, iar producția distanța parcursă.

**Producția secundară** este reprezentată de biomasa produsă de organismele consumatoare și descompunătoare.

**Biomasa** produsă și prezentă într-un habitat („Standing biomass"; „Standing crop" sau „Standing stock") este reprezentată de cantitatea de substanță organică sau de energie acumulată de o populație sau de oricare altă unitate trofică (Lincoln, Boxshall și Cox, 1982). Cantitatea mare de biomasă acumulată într-un habitat reflectă o producție brută mare, consum respirator redus sau aflux net de compuși organici de la exterior.

**Aprecierea cantitativă a producției primare** poate fi efectuată pe baza biomasei uscate (grame de C fixat/$m^2$/an) sau sub formă de unități energetice (kcal) stocate. Valorile acestora sînt interconvertibile: presupunînd că 50% din substanța organică este carbon, 1 g biomasă uscată corespunde la 5 kcal. Exprimarea producției primare în unități energetice este preferabilă.

Producția primară este variabilă în funcție de o serie de factori, fapt care explică datele foarte diferite din literatură (tabelul nr. 8).

Whittaker și Liskens (1970) apreciază producția primară netă a tuturor ecosistemelor terestre și marine la 164 miliarde tone substanță organică uscată/an. Deși solul ocupă numai 29% din suprafața Pămîntului, el produce, datorită plantelor verzi, 65% din biomasă. Din aceasta, 42% revine pădurilor

*Tabelul nr. 8*

**Producția primară netă a unor ecosisteme naturale și agricole**
(după date din literatură)

| Tipul de ecosistem | Producția primară netă (substanță organică/$m^2$/an) |
|---|---|
| Deșert | 200 |
| Tundră | 400 |
| Pajiște (regiuni temperate) | pînă la 1 500 |
| Păduri de foioase | 1 085 — 1 200 |
| Păduri de conifere | 2 000 |
| Păduri din regiuni tropicale | 2 800 |
| Culturi de orez | 340 — 1 200 |
| Culturi de proumb | 1 000 — 6 000 |
| Culturi de trestie de zahăr | 9 400 |
| Ocean Antarctic sub gheață | 1,460 |
| Ocean (în larg) | 100 |
| Ocean (zona litorală) | 200 |
| Ocean (zona curenților de convecție) | 600 |
| Recifuri de corali | 4 900 |
| Lacuri cu apă dulce | 950—1 500 |
| Lac cu înfloriri algale | 2 500 |
| Lacuri sărate | 3 400 |

și numai 6% culturilor agricole. Contribuția microorganismelor este puțin studiată și datele sînt, cel mai adesea, foarte aproximative.

Rheinheimer (1985) apreciază biomasa bacteriană într-un lac mare (1446 milioane $m^3$) la 16 753 tone carbon. În mediile acvatice, rolul major revine algelor și cianobacteriilor, care produc în epilimnion 21,66—22,24 mg C/$cm^3$/zi. În aceleași medii, bacteriile fototrofe din hipolimnion produc numai 8,46 mg C/$cm^3$/zi. În mediile acvatice, bacteriile și fungii, acționînd în calitate de consumatori și descompunători, contribuie la realizarea unei producții secundare considerabile. După Rheinheimer (1985), în funcție de condițiile locale, 20—60% din nutrienții organici sînt folosiți pentru sinteza de biomasă microbiană, restul fiind implicat în metabolismul energetic.

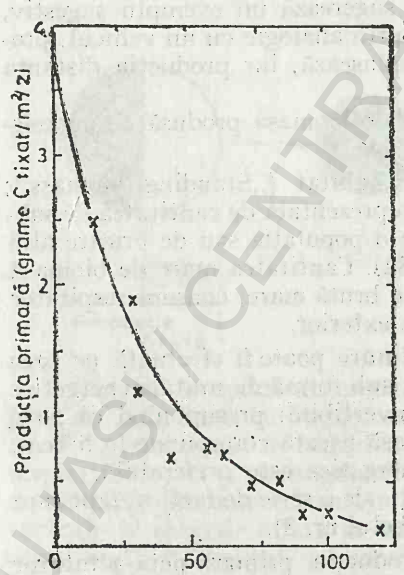



Fig. 33. — Efectul adîncimii apei asupra producției primare (după Steeman-Nielsen și Jensen, 1957).

Producția primară a ecosistemelor este expusă unor factori limitanți (fig.33). În primul rînd, cantitatea totală de energie solară fixată pe Pămînt stabilește o limită pentru dezvoltarea cantitativă a sistemelor biologice. În plus, modul în care se realizează fluxul acestei energii prin ecosisteme determină limite adiționale pentru diferitele tipuri de organisme. Poziția geografică (durata zilnică a pe-

rioadei însorite), temperatura, concentrația $CO_2$, umiditatea sau uscăciunea, prezența unor nutrienți esențiali (surse de N, P etc.) sau a unor microelemente, natura mediului respectiv (sol, mediu acvatic) sau a plantelor (culturi agricole, păduri) sînt tot atîția factori care influențează producția primară a ecosistemului.

## PRODUCĂTORII PRIMARI

Organisme autotrofe capabile să utilizeze sursele de energie originare ale ecosistemelor, producătorii primari stau la baza lanțului trofic asimilator și, prin aceasta, au o importanță esențială pentru menținerea vieții în ecosistemele acvatice și terestre. Prin acțiunea lor, energia disponibilă în mediul extern este introdusă în rețeaua trofică a ecosistemelor și stocată în structura lor pentru a fi utilizată succesiv la nivelele trofice superioare.

Producătorii primari sînt reprezentanți de două categorii majore de organisme:

**1) Organismele fotosintetizante**

Sînt reprezentate de plantele verzi terestre, de macrofitele acvatice și de microorganismele fotosintetizante. Ele capturează energia solară și, folosind diferiți compuși anorganici ($CO_2$, $HCO_3^-$, $CO_3^{2-}$, $N_2$, $NO_3^-$), fac sinteză de constituenți celulari, stocînd energia sub formă de legături chimice în molecule organice.

*Plantele verzi* fac fotosinteza ca rezultat a două procese distincte, respectiv al reacțiilor fotochimice realizate cu ajutorul luminii și al reacțiilor la întuneric prin care energia stocată în ATP și NADPH este utilizată pentru a converti $CO_2$ și H la glucoză și apă. Reacția globală este:

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O + \text{lumină} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$$

*Microorganismele fotosintetizante* sînt reprezentate de algele microscopice și de bacteriile fotosintetizante.

*Microalgele* ca grup au un rol deosebit de important în ecosistemele acvatice. Ele se încadrează, după Stewart (1984), în șase grupuri majore:

*Chlorophycophyta (Chlorophyceae)*, alge verzi, ca, de exemplu, *Chlamydomonas, Chlorella* etc.

*Euglenophycophyta (Euglenophyta)*, alge euglenoide: *Euglena, Trachelomonas, Phacus* etc.

*Chrysophycophyta (Chrysophyceae): Ochromonas, Chromulina, Cyclotella.*

*Pyrrhophycophyta (Dinoflagellatae): Peridinium, Ceratium, Gymnodinium.*

*Cryptophycophyta (Chryptophyceae)*, alge criptomonade ca: *Rhodomonas, Cryptomonas, Chroomonas.*

*Rhodophycophyta (Rhodophyta)*, alge roșii ca: *Porphyridium, Rhodosorus* etc.

Ele au în comun: 1) un sistem fotosintetizant localizat în organite distincte (cloroplaste); 2) folosesc apa ca donator de electroni; 3) fixează $CO_2$ pe calea ciclului Calvin; 4) conțin clorofilă *a* și un al doilea tip de clorofilă, precum și pigmenți accesorii, care la *Rhodophycophyta* și *Cryptophycophyta* includ ficobiline ca și la cianobacterii.

*Bacteriile fotosintetizante* sînt reunite, de Gibbons și Murray (1974, 1976), în grupul *Photobacteria.*

În funcție de structura ultrafină și moleculară a aparatului lor fotosintetizant, de natura reacțiilor biochimice și a produsului lor final, ele formează două grupuri majore:

— *Grupul Oxyphotobacteria* include procariotele capabile de fotosinteză „oxigenică" de tipul celei efectuate de plantele verzi:

$$[CO_2 + H_2O \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + O_2]$$

avînd, deci, $O_2$ molecular ca unul din produșii metabolici majori.

Din acest grup fac parte trei categorii de fototrofe procariote: *Cyanobacteriales, Prochlorophyta* și *Halobacterium (Archaebacteria).*

Ordinul *Cyanobacteriales* reprezintă grupul cel mai mare, cel mai divers și cel mai răspîndit, în special, în mediile acvatice. Cianobacteriile sînt procariote unicelulare, coloniale sau filamentoase, care utilizează apa ca donator de electroni în fotosinteză și eliberează oxigen:

$$[CO_2 + H_2O \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + O_2]$$

Conțin clorofilă *a*, ca și microalgele, și pigmenți accesorii, ca aloficocianina, ficocianina și ficoeritrina (ficobiliproteine), agregate în structuri specifice (ficobilisomi) și legate de suprafața externă a membranei tilacoizilor.

Ordinul *Prochlorales (Prochlorophyta,* Lewin, 1981) include procariote fototrofe, care conțin clorofilele *a* și *b* și produc $O_2$ prin fotosinteză. Au fost descrise ca simbionți extracelulari pe unele nevertebrate marine tropicale (ascidii) și subtropicale, care trăiesc în locuri slab iluminate. Considerate inițial ca zooclorele sau cianobacterii, formează, în realitate, un grup aparte. Singura specie identificată este *Prochloron didemni.*

*Bacteriile halofile* extreme din genul *Halobacterium* nu sînt fototrofe în sensul strict al termenului. În mediile oxigenate sînt chemoheterotrofe, deoarece se dezvoltă și la întuneric, producînd ATP prin fosforilare oxidativă. Cînd mediul este deficitar în $O_2$, produc o cromoproteină, *bacteriorhodopsina,* cu ajutorul căreia pot converti energia luminoasă la ATP.

— *Grupul Anoxyphotobacteria* include procariotele care fac fotosinteză anoxigenică (nu pot folosi apa ca donator fotosintetic de electroni și nu produc oxigen molecular). În anaerobioză, utilizează compuși reduși ai S($H_2S$ etc.), după reacția globală:

$$2\,CO_2 + H_2S + 2\,H_2O \xrightarrow{h\nu} 2[CH_2O] + H_2SO_4$$

Pe baza diferențelor de structură fină a aparatului fotosintetic și a conținutului în pigmenți aparțin la două ordine distincte:

Ordinul *Rhodospirillales* format din procariote care conțin bacterioclorofilele *a* și *b* ca principali pigmenți fotosintetici. Este alcătuit din două familii:

Familia *Rhodospirillaceae* — bacterii nesulfuroase, purpurii, numite anterior *Athiorhodaceae.*

Familia *Chromatiaceae* — bacterii sulfuroase, purpurii, numite anterior *Thiorhodaceae.*

Ordinul *Chlorobiales* (fotobacteriile verzi) este alcătuit, de asemenea, din două familii:

Familia *Chlorobiaceae* — bacterii fototrofe obligate, strict anaerobe, care conțin bacterioclorofilele *a*, *c*, *d* și *e* și unii carotenoizi specifici *(clorobacten)*.

Familia *Chloroflexaceae* — bacterii flexibile, filamentoase, „multicelulare" care se deplasează prin alunecare.

**2) Organismele chemosintetizante**

Sînt reprezentate de procariote chemoautolitotrofe capabile să utilizeze energia chimică pentru a produce substanțe organice complexe din substanțele anorganice. Pot fi:

aerobe — reacția generală tip:

$$CO_2 + H_2S + O_2 + H_2O \longrightarrow [CH_2O] + H_2SO_4$$

sau anaerobe — reacția generală tip:

$$2\,CO_2 + 6\,H_2 \longrightarrow [CH_2O] + CH_4 + 3\,H_2O$$

Exemplele cel mai bine cunoscute sînt următoarele:

1) *Nitritbacieriile* (nitrozobacteriile *Nitrosomonas, Nitrosocystis, Nitrospira, Nitrosolobus)*, prezente în sol, în apele dulci și marine, precum și în sistemele de epurare a apelor uzate, care oxidează $NH_3$ la nitriți după reacția:

$$NH_3 + 1\,1/2O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + H^+$$

2) *Nitratbacteriile (Nitrobacter, Nitrococcus, Nitrospira)*, capabile să oxideze nitriții la nitrați după reacția:

$$NO_2H + 1/2O_2 \longrightarrow NO_3H$$

Energia eliberată din ambele reacții este utilizată pentru reducerea $CO_2$.

3) *Bacteriile sulfuroase incolore* oxidează S° și compușii săi, obținînd pe această cale, deopotrivă, puterea reducătoare și energia necesară. Cele sulfoxidante, în general, și în special cele din genul *Thiobacillus* s-au diferențiat, dobîndind capacitatea de a oxida o gamă largă de substraturi ca, de exemplu:

*T. thioparus:* $2\,S^\circ + 3\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,H_2SO_4$

*T. thioparus:* $2\,Na_2S_4O_6 + 7\,O_2 + 6\,H_2O \rightarrow 2\,Na_2SO_4 + 6H_2SO_4$

*T. thiocyanooxidans:* $2\,KSCN + 4\,O_2 + 4\,H_2O \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + K_2SO_4 + 2\,CO_2$

*T. ferrooxidans:* $2\,FeS_2 + 2\,H_2O + 7\,O_2 \rightarrow 2\,FeSO_4 + 2\,H_2SO_4$

*T. ferrooxidans:* $4\,FeSO_4 + O_2 + 2\,H_2SO_4 \rightarrow 2\,Fe_2(SO_4)_3 + 2\,H_2O$

*T. denitrificans:* $8\,KNO_3 + 5\,H_2S \rightarrow 4\,K_2SO_4 + H_2SO_4 + 4\,N_2 + 4\,H_2O$

*T. denitrificans:* $6\,KNO_3 + 5\,S^\circ + 2\,H_2O \rightarrow 3\,K_2SO_4 + 2\,H_2SO_4 + 3\,N$

*Beggiatoa:* $2\,H_2S + O_2 \rightleftharpoons 2\,S^\circ + 2\,H_2O$ (reacția este reversibilă: sulful elementar depus în celule ca incluziuni este utilizat prin oxidare la $H_2SO_4$, cînd $H_2S$ din mediu este epuizat).

Activitatea de producători primari a acestor microorganisme are o semnificație limitată: cele mai multe sînt prezente în condiții specifice de

mediu, iar aportul lor în sinteza de materie organică este neînsemnat comparativ cu cel al organismelor fotosintetizante. Ele au însă o importanță deosebită în ciclul sulfului și mai ales al azotului.

Există însă două exemple în care contribuția microorganismelor chemosintetizante ca autentic producători primari este fără echivoc importantă pentru starea trofică a ecosistemelor respective:

1) Comunitățile de bacterii *(Thiomicrospira pelophila* ș.a.) dezvoltate în mediile submarine, la adîncimea de 2 500 m, în jurul „izvoarelor" hidrotermale cu temperaturi pînă la 350°C și presiuni corespunzătoare foarte ridicate. Aflate în stare liberă sau în endosimbioză cu nevertebratele marine, ele realizează sinteze organice (biomasă bacteriană), utilizînd energia rezultată din oxidarea $H_2S$ și a altor sulfuri. Reprezintă singura bază trofică care asigură dezvoltarea unei faune specifice regiunilor abisale, formată din viermi pogonofori giganți *(Riftia pachyptila)* și bivalve *(Calyptogena, Bathymodiolus)* (vezi cap. „Hidroecosfera").

2) Bacteriile chimiosintetizante dezvoltate în medii lipsite de lumină (peșteri, fisuri profunde în stînci), ca și alte situsuri terestre similare. Ele oxidează, după caz, S°, $H_2S$, sulfurile metalice, $H_2$, $Fe^{2-}$, $As^{3-}$ etc., utilizînd o parte din energia potențială pentru asimilarea $CO_2$.

## IMPORTANȚA ECOLOGICĂ A MICROORGANISMELOR FOTOSINTETIZANTE CA PRODUCĂTORI PRIMARI

Microorganismele fotosintetizante sînt prezente și semnificativ active ca producători primari, în special în mediile acvatice.

În mediile terestre, rolul lor este minor comparativ cu cel al plantelor verzi. Fac excepție mediile extreme, care împiedică existența plantelor verzi, dar în care se pot dezvolta microorganisme, în special cianobacterii (în regiunile polare, pe suprafețele expuse ale rocilor sau chiar endolitic, în fisurile microscopice sau în porii stîncilor din deșert, în apele termale sau hipersaline etc.).

În mediile acvatice, respectiv în zona limnetică a lacurilor adînci și în cea pelagică unde nu există plante superioare întreaga rețea trofică este bazată pe producția primară realizată de microorganismele fotosintetizante (fig. 34).

În apele dulci, un rol esențial revine algelor microscopice și cianobacteriilor. Exceptînd unele situații speciale, este probabil că rolul celorlalte bacterii fototrofe (purpurii și verzi) este minor. În bazinele acvatice puțin adînci se adaugă contribuția, uneori semnificativă, a macrofitelor acvatice suspendate sau plutitoare.

În mediile marine și oceanice, un rol esențial revine dinoflagelatelor ($2 \times 10^5$ celule/l în apele reci, respectiv $2{,}5 \times 10^2$ celule/l la tropice) și diatomeelor. După Benton și Werner jr. (1974), algelor marine le revin ~40% din fotosinteza globală, iar restul plantelor terestre.

Relativ recent, Sherr și Sherr (1984) consideră că o parte majoră din producția primară a mărilor și oceanelor revine formelor planctonice foarte mici, respectiv nanofitoplanctonului (<20 μm) (care ar forma cea mai mare parte din biomasa fitoplanctonică din apa de mare) și picoficoplanctonului (<2 m). Aceste două tipuri de fitoplancton ar fi cel mai bine echipate pentru a competiționa cu sărăcia de nutrienți minerali din ocean. În unele regiuni,

ele cresc cu viteze apropiate de cele maximale, realizînd o producție primară de cîteva ori mai mare decît s-a estimat inițial.

Microorganismele care fac fotosinteză oxigenică se dezvoltă, în special, în stratul bogat în $O_2$, la interfața apă/aer, în timp ce cele ce fac fotosinteză anoxigenică sînt asociate cu medii de viață strict anaerobe. Chiar speciile rare de bacterii purpurii și verzi aerotolerante, avînd un sistem transportor de electroni care permite utilizarea $O_2$ ca acceptor final de electroni, nu se pot dezvolta fototrof în prezența $O_2$, deoarece sinteza bacterioclorofilelor este represată specific chiar de o presiune parțial scăzută de $O_2$. Proprietățile lor fiziologice le limitează deci la habitate acvatice lipsite de $O_2$, care conțin însă nutrienți specifici ($H_2S$, $H_2$, compuși organici simpli) rezultați din activitatea bacteriilor chemotrofe anaerobe, localizate în sedimentul subiacent. Foarte frecvent sînt întîlnite în lacurile mîloase, poluate organic, sub un strat dens de cianobacterii, alge sau chiar plante care ecranează lumina, oprind radiațiile cu anumite lungimi de undă din lumina solară.

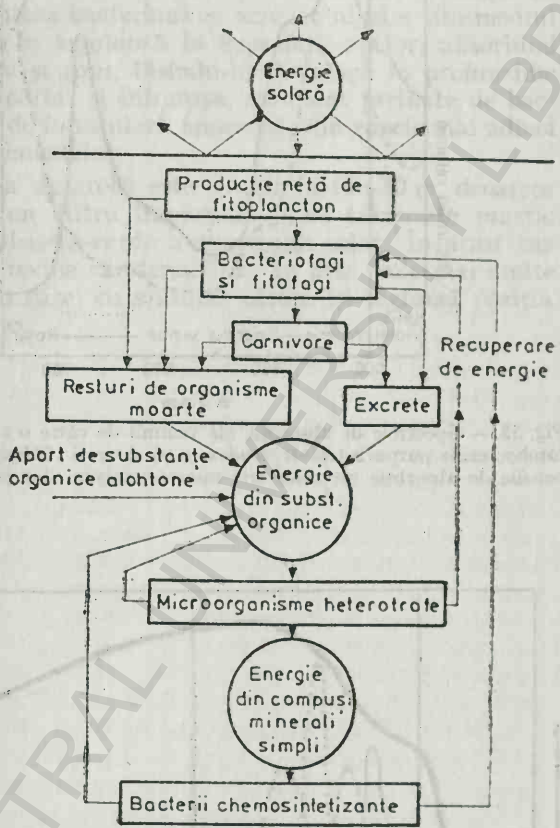



Fig. 34. — Diagramă simplificată a fluxului de energie la diferite nivele trofice ale unui bazin acvatic, evidențiind participarea microorganismelor (după Fischer, 1970).

Clorofilele bacteriene absorb radiații a căror lungime de undă este apropiată de cea a radiațiilor infraroșii și, în consecință, pot face fotosinteză în condiții de luminozitate foarte scăzută, aproape de obscuritate (corespunzînd unei zone a spectrului neperceptibilă de către ochiul omenesc). Astfel, banda de absorbție a bacterioclorofilei *b* ($\lambda = 1030$ nm) este situată foarte aproape de limita dincolo de care energia devine insuficientă pentru a determina reacții fotochimice (Stanier, 1981) (fig. 35). În mod asemănător, unele *Chlorobiaceae* pot să crească în ape adînci sub 20 m datorită prezenței unor pigmenți carotenoizi speciali, care absorb numai radiații cu $\lambda = 460$ nm) în regiunea violet a spectrului. În felul acesta, bacteriile pot trăi în ape la adîncimi mai mari, unde primesc radiațiile care au trecut prin filtrul biologic reprezentat de algele situate la suprafață. Capacitatea bacteriilor de a utiliza radiațiile infraroșii asigură utilizarea unui supliment din energia solară pe suprafața globului.

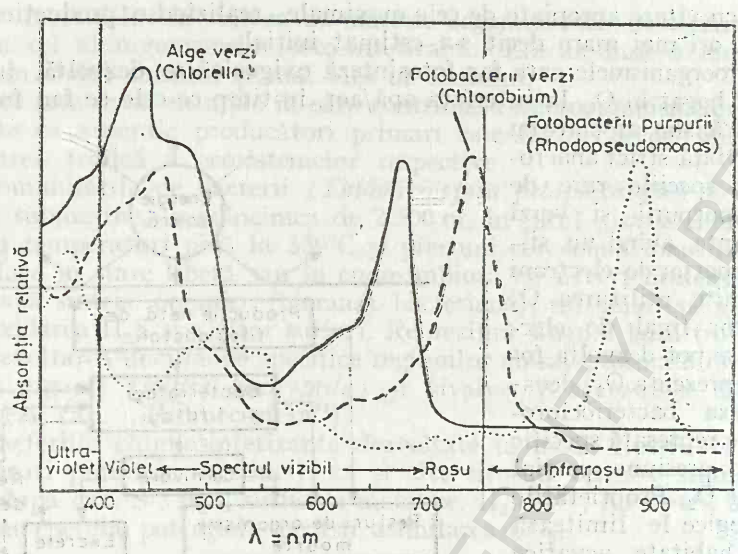



Fig. 35. — Spectrele de absorbție ale luminii de către o algă verde (*Chlorella*), comparativ cu fotobacteriile purpurii (*Rhodopseudomonas*) și verzi (*Chlorobium*). În regiunile roșu și infraroșu, benzile de absorbție ale celor trei microorganisme sînt complementare (după Stanier, 1970).

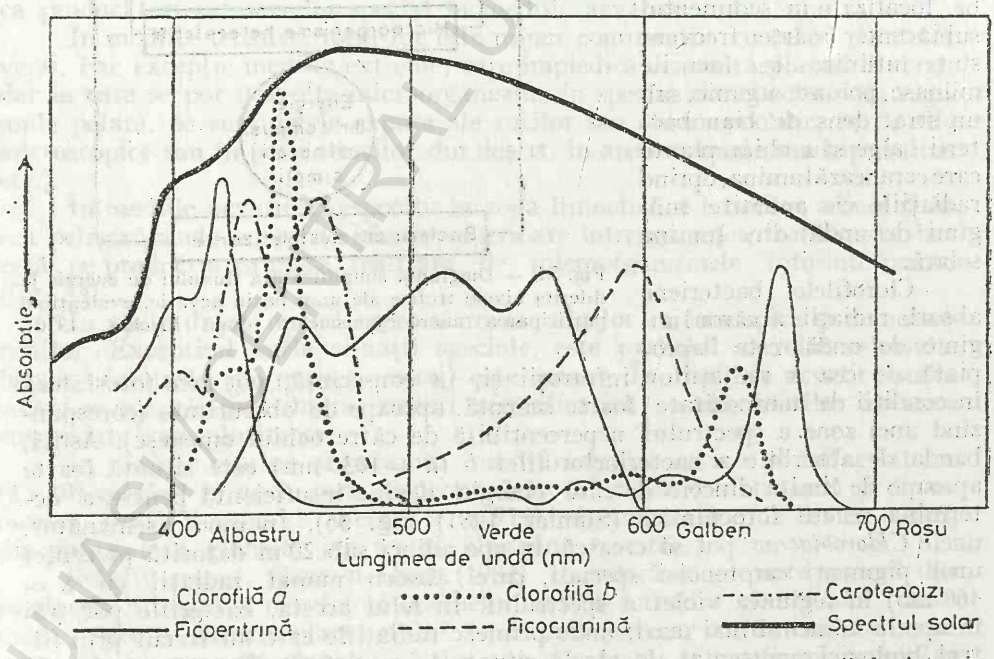



Fig. 36. — Spectrul de absorbție al diferiților pigmenți fotosintetizanți, evidențiind intensitatea cu care absorb lumina la diferite lungimi de undă. Împreună, ei absorb cea mai mare parte a luminii din spectrul solar (după Govindjee și Govindjee, 1974).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Stanier și Cohen Bazire (1981) evidențiază faptul că din suprapunerea spectrului de absorbție ale diferitelor organisme fotosintetizante rezultă că, practic, toate regiunile spectrului de lumină solară sînt folosite în fotosinteză (fig. 36). Această particularitate are ca substrat, printre altele, o relație de complementaritate între fotosinteza bacteriană și aceea a algelor din mediul acvatic: algele fac fotosinteză în aerobioză la suprafața apelor, absorbind radiațiile din regiunile albastru și roșu, lăsîndu-le să treacă în profunzime pe cele din regiunile roșu îndepărtat și infraroșu, care sînt preluate de bacteriile fototrofe în procesele lor de fotosinteză anaerobă, din zonele mai adînci ale apei și de la suprafața sedimentelor.

În lacurile oligotrofe, zona anaerobă este situată la 10—30 m, deoarece însăși coloana de apă devine un filtru important și nu transmite practic decît radiațiile din regiunea albastru-verde a spectrului solar. În acest caz rolul de „pigment de recoltă" revine carotenoizilor. În plus, cele mai multe bacterii fototrofe au vacuole cu gaze, cu ajutorul cărora își reglează poziția pe verticală în bazinele acvatice.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# DISEMINAREA MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ

**„Fiecare microorganism este întîlnit pretutindeni unde este selecționat de condițiile de mediu".**

T. D. BROCK

Prezența practic ubicvitară a populațiilor de microorganisme în natură — frecvent în medii recunoscute ca neospitaliere pentru alte forme de viață — este nu numai o dovadă a marii lor versatilități metabolice, a capacității de adaptare și de rezistență, ci și a unei dispersări eficiente, uneori la distanțe foarte mari. Într-un număr important de situații, acest fenomen reprezintă una dintre condițiile esențiale ale supraviețuirii lor. Astfel, dispersarea este o necesitate absolută pentru existența microorganismelor care colonizează habitatele cu discontinuitate în timp și spațiu ca, de exemplu, cele în care are loc epuizarea nutrienților esențiali. În mod asemănător, în cazul paraziților absolut obligați, absența diseminării ar duce la moartea lor și, pe termen lung, chiar la dispariția speciei. Existența unor modalități eficiente de dispersare a microorganismelor în natură explică funcția lor de organisme-pionier pentru medii anterior nepopulate.

Diseminarea microorganismelor în natură se poate realiza fie activ (prin mobilitate sau prin proiectarea explozivă a sporilor în cazul unor fungi), fie pasiv (fără intervenția directă a microorganismelor, cu ajutorul curenților de aer, al ploii, al apelor curgătoare etc.).

Hirst (1963) a descris două tipuri de diseminare:

1) *Obligatorie* („Imperative dispersion"), care se repetă la anumite intervale și este necesară pentru supraviețuirea speciei;

2) *Facultativă* („Capricious dispersion"), caracteristică microorganismelor ce trăiesc liber și care, periodic, pot fi răspîndite dintr-un loc în altul, dar care pot trăi și în absența dispersării.

**Condiții favorizante.** Anumite adaptări structurale și/sau fiziologice favorizează dispersarea microorganismelor în natură. Cele mai importante sînt următoarele:

1) dimensiunile foarte mici și greutatea redusă;

2) prezența mobilității și a diferitelor taxii, care permit o deplasare orientată selectiv;

3) prezența formelor de rezistență (spori, chisti etc.) cu formă aerodinamică, perete gros protector, activitate metabolică redusă, capacitate de rezistență îndelungată fără nutrienți. Există spori *(xenospori)* a căror funcție principală este cea de dispersare;

4) în unele cazuri (fungi), prezența unui număr mare de spori ($10^{12}$ per corp sporifer);

5) capacitatea de multiplicare rapidă și de colonizare promptă a habitatelor noi întîlnite etc.

În general, punctul de plecare a dispersiei este un *centru de dispersie* (Alexander, 1971), în care densitatea microorganismelor este mult mai mare decît în rest. Semnificația acestuia este foarte evidentă și bine cunoscută în cazul organismelor (om, animale, plante) cu boli transmisibile, în care organismul bolnav acționează ca *rezervor de infecție*. El elimină în mediul extern, spre exemplu, în cazul omului, pe o cale adecvată tipului de infecție (respiratorie, intestinală etc.), un număr mare de microorganisme, în anumite perioade caracteristice (ca durată, în raport cu debutul bolii etc.). În procesul de transfer spre un nou habitat nu toate microorganismele — cu rol de *propagule** — supraviețuiesc. Multe mor, dar cîteva reușesc să ajungă în habitatul nou care favorizează reluarea creșterii.

## MOBILITATEA MICROORGANISMELOR ȘI TAXIILE

Mobilitatea bacteriilor este un caz particular de „înot", respectiv de deplasare în medii lichide, deoarece se produce numai în mediile naturale sau în cele de cultură lichide, precum și în peliculele de lichid care acoperă mediile solide sau solidificate. Este realizată, cel mai adesea, de un număr variabil (1—100) de apendice filamentoase fine (flagelii de tip procariot)** puse în mișcare de un motor rotativ cu 3000—4000 turații pe minut. Flagelii se învîrtesc în jurul propriului lor ax, ca o elice microscopică, propulsînd în acest fel celula. Sursa de energie care asigură rotația este reprezentată de potențialul electrochimic al protonilor (forța protonmotrice).

Prin analogie cu sistemele tehnice, Berg (1982) consideră că motorul flagelar de la *E. coli* poate fi considerat ca un motor cu propulsie ionică și comandă moleculară, cu transmisie directă, mers înainte și în marche-arrière și cu distanța de frînare în medii vîscoase de o miliardime de milimetru.

În absența unor stimuli speciali, celulele bacteriene parcurg un drum tridimensional întîmplător, făcînd scurte deplasări prin înot în linie dreaptă (cu durata de ~1 s), întrerupte de schimbări bruște de direcție, consecutive unei mișcări de rostogolire efectuate în ~0,1 s. În mod normal, motorul rotativ funcționează în sens antiorar (opus acelor unui ceasornic), asigurînd propulsarea celulei în linie dreaptă. Cînd sensul de rotație se schimbă, devenind orar (în sensul mișcării acelor unui ceasornic), fasciculul de flageli se răsfiră, datorită forțelor de torsiune create. Mișcarea haotică a celulei, ca răspuns la un număr mare de flageli care se rotesc, fiecare trăgînd în altă direcție, pentru a realiza tranziția de la un tip de rotire la altul, determină rostogolirea celulei.

**Viteza de deplasare.** Deși viteza absolută de deplasare a bacteriilor este mică, datorită dimensiunilor lor, viteza relativă, raportată la mărimea corpului, este foarte mare și comparativ cu alte organisme, fără echivalent în biologie. În condiții speciale, unele bacterii se pot deplasa cu aproximativ 100 de lungimi ale corpului lor pe secundă, ceea ce ar corespunde pentru omul adult la ~600 km/oră. Pentru comparație menționăm că peștii mari

---

* *Propagule* (lat. propago = a răspîndi, a înmulți) : termen folosit frecvent în ecologia microorganismelor pentru a desemna orice parte a unui organism, produsă sexuat sau asexuat, care este capabilă să acționeze ca unitate de dispersare, dînd naștere unui individ sau unui număr minim de indivizi dintr-o specie, necesar pentru colonizarea unui habitat nou.

** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 366.

oceanici pot înota cu viteza de numai 10 lungimi ale corpului/secundă, iar omul înotător (recordul mondial) cu puțin mai mult de o lungime pe secundă. Chiar animalele care fug foarte repede se deplasează cu viteze incomparabil mai mici. În plus, este de menționat că în timp ce la multe animale viteza relativă de deplasare scade datorită oboselii (omul poate să fugă 200 m cu viteza de 35,5 km pe oră, iar 1600 m cu viteza de numai 24,5 km/oră), bacteriile se deplasează în medii adecvate cu viteză mare, probabil datorită energiei protonice pe toată durata vieții lor.

## CHEMOTAXIA

**„Comunicarea chimică este un fenomen biologic foarte general, unul dintre atributele fundamentale ale vieții însăși".**

E. O. Wilson

Observații mai vechi, cvasiempirice, au sugerat și experimente moderne riguroase au confirmat faptul că direcția de deplasare a bacteriilor este orientată preferențial sub efectul concentrației inegale a unor substanțe chimice din mediu, care exercită un control molecular.

Efectul este fie de *atractant (chimiotactic pozitiv)*, fie de *repelent (chimiotactic negativ)* și este determinat de o comportare selectivă în funcție de natura bacteriilor.

Cele mai multe substanțe capabile să inducă un răspuns chemotactic în natură sînt necunoscute. În condiții de laborator au fost demonstrate următoarele efecte pentru *Escherichia coli* (Chet și Mitchell, 1976):

*Atractanți:* L-aminoacizii alanină, serină, asparagină, cisteină, glicocol, metionină, treonină și glucidele N-acetil-D-glucozamină, 6-deoxi-D--glucoză, D-fructoză, D-galactoză, D-fucoză, lactoză, maltoză etc.

*Repelenți:* acizii grași și analogii lor, alcoolii alifatici, indolii, compușii aromatici, mercaptanii și ionii anorganici. Repelenții pot fi grupați în nouă clase, fiecare clasă avînd un chemoreceptor distinct.

### Aspecte comportamentale ale mobilității bacteriilor în natură

Teoretic, deplasarea tridimensională aleatorie reprezintă o risipă de energie chiar dacă în cazul unei celule bacteriene cu un singur flagel funcționarea acestuia consumă numai 0,1% din energia disponibilă pentru mobilitate. Această afirmație a fost confirmată de Pilgram și Williams (1976), care au demonstrat că într-un mediu competitiv capacitatea de a se deplasa orientat, într-o direcție utilă, reprezintă un avantaj: celulele mobile le depășesc numeric pe cele imobile într-un mediu limitant, iar cele capabile de răspuns chemotactic depășesc mutantele nechemotactice.

Bacteriile răspund atît la modificările de concentrație din diferite regiuni ale mediului *(gradient spațial)*, cît și la modificări în timp *(gradient temporal)*. Datele experimentale demonstrează că deplasările în gradiente de substanțe chimice se realizează prin modificarea sensului de rotație a flagelului. Cînd bacteriile înoată în direcția „bună" (spre un atractant), ele

„urcă" gradientul de concentrație prin creșterea duratei de deplasare în linie dreaptă și diminuarea frecvenței rostogolirilor. Invers, în cazul tendinței de deplasare în direcție „rea", frecvența rostogolirilor crește, determinînd scurtarea deplasării în linie dreaptă și îndepărtarea de repelent. Efectul final este acela că bacteriile se acumulează aproape de sursa de atractant și departe de cea de repelent.

### Rolul chemoreceptorilor

Studiile experimentale au demonstrat, fără echivoc, că deplasarea orientată în natură este determinată de prezența pe suprafața bacteriilor a unor chemosensori sau dispozitive senzoriale de chemotaxie. Alcătuite dintr-un component de recunoaștere *(chemoreceptor)*, care leagă diferitele substanțe chemotactice, aceste structuri prelucrează informația primită din mediu (recunoașterea specifică a diferitelor substanțe) și o transmit la aparatul motor, modificîndu-i comportamentul, respectiv direcția de rotație a acestuia. Russo și Koshland Jr. (1983) au studiat funcționarea receptorului pentru aspartat, implicat în chemotaxie la *Salmonella typhimurium* (fig. 37).

Legarea substanței efectoare este urmată de o modificare conformațională a receptorului, care generează un semnal neidentificat ce controlează direcția de rotație a flagelului. El nu este un simplu dispozitiv de înregistrare și transmitere a semnalului prin membrana bacteriei, ci are un rol important în prelucrarea informației, fiind direct implicat în adaptarea sensului de deplasare în funcție de cerințele mediului.

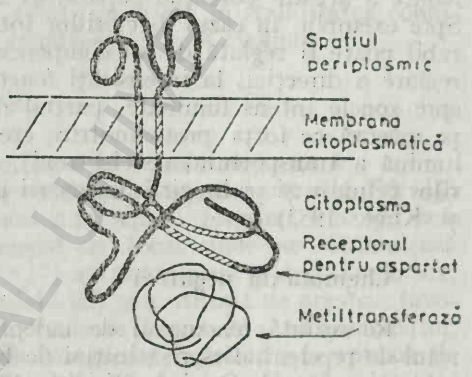



Fig. 37. — Structura ipotetică a receptorului de aspartat. Domeniul aminoterminal care leagă aspartatul este localizat în periplasmă, iar cel de semnalizare (carboxiterminal), în citoplasmă. Receptorul este reprezentat la scară, corespunzător unei grosimi a membranei interne de 3,5 nm. Porțiunile hidrofobe (23 de aminoacizi) sînt localizate în membrană, iar peptidele metilate (23 și 24 de aminoacizi) sînt prezentate haşurat. Metiltransferaza (31 kdal) este reprezentată la aceeași scară ca și receptorul (după Russo și Koshland Jr., 1983).

Sistemul senzorial bacterian este sensibil la modificările chimice ale mediului ca și cum ar compara mediul anterior cu cel prezent. Sensibilitatea temporală permite bacteriilor să aprecieze modificările locale de concentrație a diferitelor substanțe, chiar subtile, foarte importante în cazul substanțelor sintetizate sau degradate în timp. Ele au un fel de „memorie", care implică posibilitatea de a compara trecutul și prezentul și de a-și „reaminti" că mai înainte a existat o concentrație diferită de cea prezentă. „Memoria" bacteriilor nu este de lungă durată, ca la organismele superioare, dar suficientă pentru a optimiza funcțiile lor biologice.

În același timp, bacteriile sînt capabile să integreze mai multe date senzoriale prin adiția algebrică a stimulilor. Mecanismul central de reglare a rostogolirilor primește informații de la toți receptorii și le prelucrează pentru a produce un semnal unitar care controlează direcția de rotație a motorului flagelar. În cazul în care mediul natural conține atît atractanți,

cît și repelenți, bacteriile „decid" între atracție sau repulsie, în funcție de concentrație relativă a celor două tipuri de substanțe. Deci, ele posedă un *sistem rudimentar de prelucrare a informației* și, după expresia lui Ordal (1985), o „judecată primitivă", care le determină comportamentul în prezența unor stimuli conflictuali.

Chemotaxia bacteriană furnizează un model primitiv pentru sistemele sensoriale de la animale (Koshland Jr., 1974). Selecția chemoreceptorilor pentru anumite substanțe chimice specifice s-a realizat în cursul evoluției bacteriilor ca rezultat al prezenței acestor bacterii în mediu. Prezența acestor chemoreceptori la microorganismele specifice existente în ecosistemele contemporane le conferă un avantaj selectiv evident.

Bacteriile dispun și de alte sisteme de orientare a deplasării. Astfel, prezența $O_2$ este „simțită" pe calea catenei de transport a electronilor. Lumina este înregistrată de către bacteriile fotosintetizante pe calea centrului de reacție fotochimică, iar variațiile în concentrația acizilor sau alcalilor slabi, direct prin valoarea de pH intracelular. Toți acești factori afectează direct potențialul de membrană și sugerează, deci, existența unui sistem de semnalare a acestui potențial capabil să reacționeze coordonat cu alte sisteme. Spre exemplu, în cazul bacteriilor fototrofe, deplasarea spre un mediu favorabil poate fi reglată de un component cinetic, dar și de un mecanism de reglare a direcției: la intensități foarte reduse de lumină, ele se deplasează spre zonele intens luminate, parțial datorită creșterii vitezei de deplasare, pe măsură ce forța protonmotrice crește (ca răspuns la activarea de către lumină a transportului de electroni), și parțial datorită reducerii rostogolirilor celulare și prelungirii deplasării în aceeași direcție (Rowbury, Armitage și King, 1983).

### Chemotaxia negativă

Reprezintă fenomenul de îndepărtare de o substanță chimică avînd rolul de repelent. Descrisă inițial de Engelmann (1881, 1883), față de o concentrație mare de $O_2$ și de Pfeiffer (1883), față de acizi și alcali, a fost confirmată de numeroase experimente moderne: *Spirillum* sp., care intră într-o regiune cu conținut ridicat de NaCl, rămîne imobilizată aproximativ 30 s, după care „fuge" înapoi. Bacteriile evită pătrunderea într-un gradient de substanțe repelente, prin mărirea frecvenței rostogolirilor și scurtarea deplasării în linie dreaptă.

Gama substanțelor repelente în condiții naturale este necunoscută. În cercetările de laborator, ele includ: acizii grași, alcooli alifatici, indolul, compușii aromatici etc. Metalele grele și hidrocarburile au efect repelent pentru bacteriile marine, fenolii pentru *Salmonella typhimurium*, $H^+$ pentru *Pseudomonas fluorescens*, $O_2$ pentru bacteriile anaerobe în general.

Deși majoritatea repelenților sînt toxici, toxicitatea *per se* nu este nici necesară și nici suficientă pentru a genera un răspuns chimiotactic negativ. Acest fenomen reprezintă un avantaj selectiv pentru bacteriile mobile, pentru că dispun de un mecanism prompt și eficient de detectare și de îndepărtare de regiunile nefavorabile, cu efecte subletale sau chiar letale. El are și unele aplicații practice: încorporarea repelenților în vopsele poate împiedica formarea biofilmelor bacteriene și final a fulingului în regiunea submersă a navelor și a diferitelor instalații expuse acestui fenomen.

### Importanța ecologică a blocării chemoreceptorilor

Numeroși cercetători au demonstrat posibilitatea inhibării sau blocării funcționale a chemoreceptorilor și, în consecință, diminuarea sau anularea răspunsului chemotactic sub influența unui număr important de substanțe toxice (țiței, toluen, fenoli, cloramine, amine biogene, eter, cloroform, etanol etc.).

Fenomenul are o deosebită importanță ecologică mai ales pe termen lung, deoarece poate avea o serie de consecințe negative ca de exemplu:

1) incapacitatea microorganismelor de a detecta o serie de substanțe utile, nutrienți sau pradă vie;

2) alterarea capacității microorganismelor marine de a controla procesele de autopurificare din mări;

3) apariția unor fenomene de adaptare în prezența poluanților, respectiv a unor specii noi mai puțin sensibile chemotactic (Wals și Mitchell, 1974).

Ele ar putea avea drept consecință modificarea comunității de microorganisme datorită constrîngerilor impuse de mediu, atît în ceea ce privește diversitatea speciilor, cît și numărul de populații. Aceste modificări se pot reflecta, după Chet și Mitchell (1976), printr-un declin în stabilitatea comunității de microorganisme sau chiar a organismelor mai evoluate.

### Chemotaxia determinată de sex

Aceasta a fost semnalată la toate tipurile de microorganisme.

**Bacterii.** Bezdek și Soska (1972) au demonstrat că bacteriile Hfr (♂) de *Salmonella typhimurium* se deplasează mai repede, formînd o bandă care înaintează pentru a se apropia preferențial de locul unde se acumulează celulele F⁻. Ei consideră că celulele F⁻ (♀) ar produce un atractant de sex, care poate fi recunoscut specific de celulele Hfr sau utilizat de acestea, favorizînd contactul între celule cu tip de încrucișare diferit. În mod asemănător, Clewell (1981) a evidențiat că celulele de *Streptococcus faecalis*, receptoare de material genetic, sintetizează feromoni de sex care stimulează contactul intercelular și transferul plasmidelor conjugative*).

**Fungi.** Existența unor semnale chimice de tipul feromonilor sexuali au fost descrise la *Saccharomyces cerevisiae (factorul α)*, *Rhodospirillum toruloides (rhodotorucina)* și la mai multe specii de *Tremella (tremerogenii)*. Fenomenul ar fi general în sensul că substanțe similare ar avea un rol esențial la toți fungii ce se reproduc sexuat. Astfel, gameții ♂ de la fungii acvatici *Allomyces macrogynus* și *A. arbuscula* sînt atrași de gameții ♀ care secretă un hormon atractant *sirenina* cu acțiune foarte specifică.

**Alge.** Influența fenomenelor chemotactice determinate de sex au fost semnalate la mai multe alge. Alga mobilă *Chlamydomonas* este capabilă de diferențiere în gameți de două tipuri de încrucișare, care se aglutinează în cupluri, prin intermediul flagelilor. Reacția ar fi determinată de secreția în mediu a unui gamon** atractant specific (Chet și Miller, 1976).

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 369.

** Gamon — substanțe de atracție sexuală, secretate de celulele sexuale ♀ (*ginnogamoni*) sau ♂ (*androgamoni*). Au fost descrise la alge, fungi și la unele organisme mai evoluate.

**Protozoare.** Fenomenele de conjugare studiate la ciliate necesită, de asemenea, intervenția unor semnale specifice de încrucișare (Miyake, 1981). La unele ciliate *(Paramecium, Tetrahymena* etc.), semnalele chimice specifice rămîn legate de suprafața celulei, interacțiunea specifică fiind condiționată de coliziunea celulelor cu tipuri diferite de încrucișare. În alte cazuri ca, de exemplu, la *Blepharisma japonicum* semnalele chimice de încrucișare care induc comportamentul ciliatelor (gamonii *blefarmona* și *blefarismona)* sînt secretate în mediu (Rowbury, Armitage și King, 1983).

**Mobilitate și taxii la protozoare în mediile naturale.** În funcție de organizarea lor celulară, protozoarele prezintă două tipuri de mobilitate:

I. *Mișcarea amiboidală*, lentă (0,02 μm—2 μm/s$^{-1}$), descrisă ca tipică la *Amoeba proteus* și studiată în amănunt la unele celule fagocitare (leucocite polimorfonucleare).

O celulă amiboidală este, în termenii cei mai simpli, o masă de citoplasmă înconjurată de o membrană flexibilă și deformabilă — plasmalema. Mobilitatea pare să se realizeze prin „scurgerea" citoplasmei în proiecții temporare — pseudopode — care dispar pe măsură ce a avut loc înaintarea celulei pentru a se reface în altă regiune a celulei. Cînd celulele se mișcă, citoplasma este dislocată sub forma unui curent în direcția de mișcare. După concepțiile tradiționale, mobilitatea amiboidală este determinată de transformări alternative ale stării citoplasmei, de la starea de coloid lichid (sol) la o stare de coloid mai solid (gel).

Fenomenul ar implica, pe de o parte, interacțiuni de tip actină/miozină și celulă/substrat. Starea de gel ar rezulta din interacțiunea actinei cu proteinele de legare a actinei, iar contracția care are loc la interfața gel/sol ar implica participarea miozinei (Hellewer și Taylor, 1979). Clasic, conversiile sol/gel au loc în capătul anterior, iar cele gel/sol în cele posterioare ale celulei. Efectul lor generează „scurgerea" citoplasmei din regiunea posterioară spre cea anterioară (fig. 38).

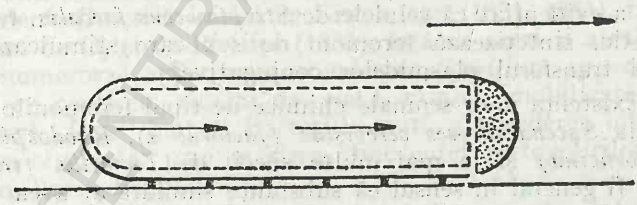


Fig. 38. — Reprezentarea schematică a deplasării amibelor pe un substrat (vedere laterală). Săgețile intracelulare indică fluxul citoplasmatic, Punctele negre (●) marchează forțele de aderiune dintre celulă și substrat (după Rowbury, Armitage și King, 1983).

*Mecanismul exact al mișcării amiboide* este necunoscut. Au fost propuse trei ipoteze:

1) *Modelul contracției posterioare* („Rear contraction") (Mast, 1926), cunoscut și sub denumirea de *ipoteza tubului de pastă de dinți*, admite că prin contracția tubului citoplasmatic în regiunea sa posterioară se dezvoltă forța necesară pentru a împinge înainte conținutul citoplasmatic. Fenomenul este

favorizat de o relaxare concomitentă în regiunea frontală a celulei. Mecanismul presupune, deci, existența unui gradient de presiune de-a lungul axului celular, din direcția posterioară spre cea anterioară.

2) *Modelul contracției frontale* (Allen, 1961) are la bază ideea unei restructurări citoplasmatice la capătul frontal al celulei asociată cu relaxarea concomitentă a regiunii posterioare.

3) *Modelul contracției corticale* (Grebecka și Grebecki, 1981) se bazează pe posibilitatea apariției unor contracții pe întreg tubul cortical. Presiunea hidrostatică dezvoltată produce o protruzie la extremitatea frontală, din care se formează pseudopodul. Regiunea frontală și chimiotactismul au un rol major în stabilirea direcției de deplasare.

*Importanța ecologică.* Mișcarea amiboidă are un rol esențial în detectarea surselor potențiale de hrană. Celulele bacteriene sau unele produse ale lor au rol de atractant chiar în doze foarte mici ($10^{-10}$ M).

II. *Mișcarea ciliară sau flagelară* este rapidă (50—300 $\mu m/s^{-1}$). Este realizată de organite motorii, specializate pentru realizarea unui travaliu mecanic, cu structură de tip eucariot (9×2+2), alcătuită din 9 dublete microtubulare dispuse la exteriorul axonemei și doi microtubuli centrali, neasociați într-un dublet.

*Flagelii*, relativ lungi (10 μm) și puțin numeroși (1 la *Trypanosoma*, 2 la *Chlamydomonas*), se mișcă prin ondulații simetrice în același plan, de la bază spre vîrf, sau, mai rar, invers. Analog bătăii unei vîsle, mișcarea flagelului poate fi descompusă, în sensul că fiecare ciclu de mișcare este alcătuit dintr-o bătaie activă (care provoacă curbarea bazei flagelului) și alta de revenire sau de întoarcere, care asigură propagarea curburii pînă la extremitatea distală a flagelului.

*Cilii*, avînd aceeași structură internă, sînt scurți și numeroși (3000—14 000 la *Paramecium* sp.). Deplasarea ciliatelor este rezultatul unor mișcări vibratile ale cililor (cu 10—40 bătăi pe secundă), rezultat al unor „bătăi" eficiente și de revenire coordonate pentru a forma în cazul cililor multipli unde metacronale, comparate clasic cu efectul unei adieri de vînt asupra unui lan de grîu. Coordonarea mișcării cililor considerată inițial ca rezultatul unui transfer de informație este rezultatul cuplării vîscoase între cilii adiacenți.

*Semnificația ecologică a chimiotaxiei protozoarelor.* Deși natura chemoreceptorilor de la protozoare nu este cunoscută, este evident că și ele au reacții similare celor descrise la bacterii, cu consecințe importante, deoarece asigură următoarele efecte benefice:

— localizarea surselor de hrană și deplasarea în direcția acestora;

— recunoașterea diferitelor tipuri de încrucișare în vederea conjugării. Rolul de chemoatractant este jucat de semnale chimice specifice, care rămîn legate de suprafața celulei (*Paramecium*, *Tetrahymena*) sau sînt eliberate în mediu (*Blepharisma japonicum*);

— îndepărtarea de regiunile nefavorabile (modificări de pH, repelenți etc.);

— localizarea selectivă a protozoarelor patogene în anumite organe-țintă;

— stabilizarea celor care au o fază sesilă (de exemplu, *Vorticella* din apa de mare) pe substraturi solide adecvate (Rowbury, Armitage și King, 1983).

## Mecanotaxiile

Protozoarele ciliate au capacitatea de a răspunde adaptativ la diferite obstacole din mediu, care induc, probabil, modificări bioelectrice ale membranei plasmatice. Forma tipică a fost descrisă inițial de Jenning (1906) sub denumirea de *reacție de evitare* („Avoiding reaction"): ea determină o mișcare ciliară inversă ori de cîte ori *Paramecium* sp., care înoată „înainte", se lovește de un obstacol. După o scurtă mișcare de recul, înainte de a-și relua drumul înainte, protozoarul suferă o rotație de un anumit grad în jurul extremității posterioare, astfel încît înoată într-o direcție modificată, ocolind obstacolul. Stimularea mecanică anterioară determină reacția de evitare, iar cea posterioară provoacă o creștere a frecvenței bătăilor eficiente și deplasarea mai rapidă înainte.

Natura mecanoreceptorilor nu este cunoscută.

Fenomene similare au fost descrise și la unele bacterii, fără a putea fi explicate prin prezența unor mecanoreceptori specifici sau a altor sisteme de semnalizare.

## Fototaxia

Microorganismele fotosintetizante dispun de mecanisme care le permit să se adapteze la modificările de intensitate ale luminii, deplasîndu-se în regiunile cele mai favorabile pentru supraviețuire, creștere și multiplicare.

Fenomenul a fost evidențiat de Engelmann (1883), care a semnalat capacitatea bacteriei *Bacterium photometricum* (înrudită cu *Chromatium okenii)* de a înota liber cînd este iluminată uniform și de a fi imobilizată temporar, înainte de a-și relua mobilitatea, cînd este expusă brusc la întuneric. Imobilizarea este atît de bruscă încît a fost descrisă sub denumirea de „Schreck bewegung" (germ. = imobilizare de spaimă sau mișcare de șoc („Shock movement"). Acumularea bacteriilor într-o pată de lumină, ca într-o capcană, se explică prin capacitatea lor de a înota în interiorul, dar nu și în afara ei. Cînd cultura este iluminată cu un spectru luminos, celulele bacteriene se aglomerează în regiunea corespunzătoare lungimii de undă la care ele pot răspunde. Bacteriile nu răspund la cantitatea absolută de lumină, ci la diferențele de intensitate. Sistemul este foarte sensibil, deoarece discerne diferențe de numai ~5%.

Răspunsul este corelat cu natura pigmenților fotosintetizanți. Expuse (într-un preparat proaspăt) unui spectru de lumină (care a traversat o prismă), bacteriile purpurii mobile se acumulează în regiunile cu lungimi de undă corespunzătoare benzilor de absorbție principale ale sistemului de fotopigmenți cu care sînt echipate, respectiv: 500 nm (poziția benzilor de absorbție a pigmenților carotenoizi) și 590, 800, 850 și 900 nm (benzile de absorbție ale clorofilei.

Fototaxia reprezintă pentru bacteriile purpurii un avantaj biologic major, deoarece ele trăiesc frecvent sub un filtru biologic de lumină. Stanier (1976) consideră că reacția fototactică a bacteriilor este negativă. Ele nu se îndreaptă spre regiunile optime fiziologic, ci sînt împiedicate să se deplaseze în zonele nefavorabile.

Brock (1966), lucrînd cu *Rhodospirillum rubrum*, este adeptul unui punct de vedere diferit. El consideră că aceeași bacterie poate prezenta foto-

taxie pozitivă sau negativă, în funcție de condițiile de mediu. Ca urmare, ea se poate deplasa spre lumină cînd condițiile de mediu permit fotosinteza sau spre întuneric atunci cînd acestea o împiedică (de exemplu, în cazul concentrațiilor mari, toxice, de $O_2$).

Cercetările moderne au demonstrat că atît răspunsul pozitiv, cît și cel de fotofobie sînt corelate cu variațiile forței protonmotrice*. Astfel, bacteriile fototrofe purpurii se deplasează într-un gradient util de lumină, cu o viteză mărită, datorită creșterii forței protonmotrice și a semnalelor specifice transmise flagelului bacterian.

Proba este făcută și de comportamentul unor bacterii nefototrofe: *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium* reacționează la un flash de lumină albastră prin rostogoliri. Mecanismul molecular este reprezentat de fotooxidarea flavinelor din catena transportoare de electroni, sub acțiunea luminii albastre, care determină o scădere temporară a forței protonmotrice.

Bacteria *Halobacterium halobium*, care dispune de o pompă protonică pusă în mișcare de lumină, prezintă un răspuns fototactic, corelat cu lungimea de undă a luminii incidente. Lumina cu $\lambda = 370$ nm are un efect repelent, iar cea cu $\lambda = 565$ nm, detectată de bacteriorodopsină, este atractantă. Creșterea frecvenței luminii la $\lambda = 565$ nm produce o mărire a forței protonmotrice (fpm), în timp ce radiațiile cu $\lambda$ mică măresc permeabilitatea pasivă a membranei pentru protoni și reduc fpm.

Rowbury, Armitage și King (1983) insistă asupra importanței ecologice a răspunsului fototactic, deoarece în mediile acvatice acesta permite acumularea bacteriilor într-o poziție optimă pentru utilizarea luminii. Dezvoltarea optimă în natură a bacteriilor purpurii necesită condiții de anaerobioză, asociate cu o iluminare maximă, cu lungimea de undă ($\lambda$) adecvată. Această condiție este realizată într-un lac stratificat sub termoclină, iar în apele puțin adînci la suprafața sedimentului. Datorită acțiunii luminii asupra sistemelor fotosensibile, bacteriile se deplasează spre regiunile cu lungimi de undă utile, prin mărirea vitezei de deplasare sau își schimbă direcția prin rostogolire, dacă întîlnesc condiții nefavorabile (reducerea intensității luminii sau prezența unor lungimi de undă neadecvate).

### Fototaxia algelor flagelate

Studiile efectuate, în special pe *Euglena* și *Chlamydomonas*, au evidențiat un răspuns mai complex, corespunzător diferențelor fundamentale dintre procariote și eucariote sub raportul arhitecturii și funcțiilor celulare.

Ele prezintă, în primul rînd, *topotaxie*, respectiv capacitatea de a percepe și de a deplasa în funcție de direcția din care vine lumina.

În al doilea rînd, algele flagelate prezintă un *răspuns fototaxic invers*, în sensul că se deplasează din regiunile foarte intens iluminate spre cele mai puțin iluminate (fig. 39).

Răspunsul fototactic al algelor este foarte eficient pentru că el cumulează fototaxia cu o sensibilitate extrem de mare: limita inferioară de sensibilitate fototactică la alga colonială *Eudorina elegans* este de ~10 000 de

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 135.

ori mai mică decît la *Rhodospirillum rubrum*. Fototaxia este manifestă și la protozoarele ce adăpostesc endosimbionți algali fotosintetizanți, care acționează ca fotoreceptori. Mobilitatea protozoarului pare să fie controlată de concentrația internă a $O_2$, deoarece fototaxia este evidentă numai cînd cantitatea de $O_2$ din mediu este limitată.

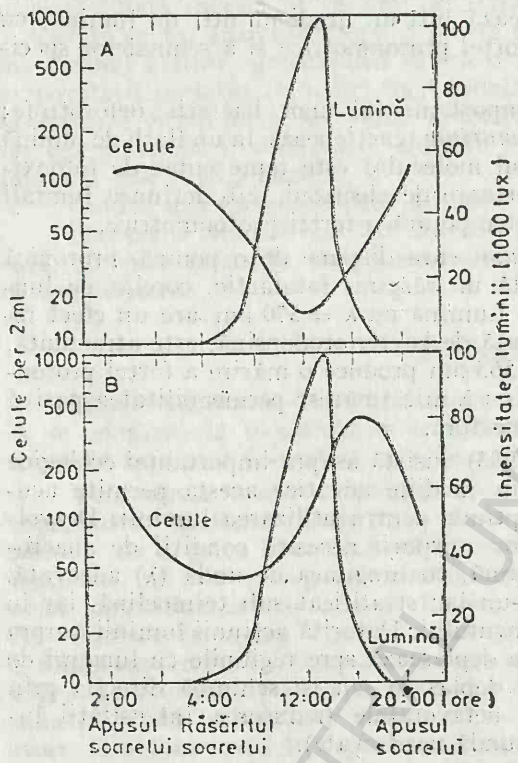



Fig. 39. — Migrarea verticală diurnă a două dinoflagelate în coloana de apă. A. *Ceratium fusus*. B. *Conyaulax polyedra*. Modificările numărului de celule la suprafața apei reflectă deplasarea lor verticală sub influența variațiilor de intensitate a luminii (după Hasle, 1950).

## Aerotaxia

Descrisă încă de Beijerinck, aerotaxia implică deplasarea ordonată a bacteriilor mobile într-un gradient de $O_2$, pentru a ocupa o poziție favorabilă, adecvată exigențelor lor respiratorii. Condițiile care măresc forța protonmotrice* (energia chemiosmotică) măresc viteza de deplasare a bacteriilor strict aerobe în linie dreaptă, în direcția avantajoasă, determinînd suprimarea rostogolirilor. Manifestarea ei este condiționată de existența unui sistem citocromic funcțional. Bacteriile anaerobe evită regiunile bogate în $O_2$, printr-o comportare exact inversă.

Fenomenul poate fi folosit în practică pentru determinarea tipului respirator al bacteriilor. În acest scop, într-un preparat, între lamă și lamelă, cele aerobe se ordonează la periferia lamelei, cele anaerobe în regiunea centrală, iar cele microaerofile ocupă o poziție intermediară.

Bacteriile purpurii *Rhodopseudomonas* și *Rhodospirillum* au o comportare mai complexă. Cînd sînt expuse la lumină, ele se dezvoltă în anaerobioză, ca microorganisme fotosintetizante, și prezintă fototaxie, datorită stimulului reprezentat de creșterea potențialului de membrană prin activitatea mărită a centrului de fotoreacție. Ele se dezvoltă însă și la întuneric, în aerobioză, ca heterotrofe. În acest caz, prezintă aerotaxie pozitivă prin inducția terminal-oxidazei, ca răspuns la prezența $O_2$ și creșterea consecutivă a forței protonmotrice (Rowbury, Armitage și King, 1983). Cele două răspunsuri sînt perfect reglate, întrucît concentrațiile mari de $O_2$ sînt dăunătoare bacteriilor fotosintetizante.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 124.

## Viscotaxia

Influența modificărilor de vîscozitate asupra microorganismelor este greu de definit, în primul rînd datorită dificultăților de studiu.

Datorită dimensiunilor (lungimea de 4—100 μm) și fineței flagelilor (∅ 12—25 nm), bacteriile întîmpină dificultăți enorme în obținerea autopropulsiei. Yates (1986) consideră că pentru a întîlni forțe de vîscozitate comparabile celor care acționează asupra bacteriilor ar trebui ca omul să înoate într-un mediu de un milion de ori mai vîscos decît apa, așa cum ar fi melasa sau chiar smoala. Aceasta explică de ce bacteriile cu flageli externi tipici, indiferent de forma corpului lor, sînt imobilizate la viscozități mai mici decît bacteriile spiralate sau decît cele care se deplasează prin alunecare.

Spirochetele, spre exemplu, au flageli internalizați (periplasmatici), localizați între membrana externă și cea plasmatică, relativ insensibili la constrîngerile viscozității. Ei produc o contrarotație de-a lungul axului lung al celulei, generînd o mișcare de rotație („în tirbușon") ce asigură deplasarea înainte în mediile viscoase.

În mod asemănător, leptospirele preferă mediile vîscoase și răspund pozitiv în prezența lor. Datorită acestei particularități, formele lor libere sînt localizate preferențial în sedimente acvatice, iar cele parazite pe suprafața mucoaselor, acoperite de un strat de mucus. Acest comportament este asociat cu unele modificări anatomice induse de mediile vîscoase, respectiv o deformare mecanică a helicei semirigide a „capului celulei". Ele au drept consecință o creștere a eficienței hidrodinamice și a vitezei de înot.

În cazul microorganismelor patogene, capacitatea de a înota rapid în mediile viscoase favorizează invazia țesuturilor.

## Termotaxia

Temperaturile mai ridicate — în limite fiziologic admise — măresc viteza de deplasare a microorganismelor, probabil ca rezultat al diminuării frecvenței de rostogolire și respectiv al prelungirii deplasării în linie dreaptă. Scăderea temperaturii determină un efect diametral opus.

La *Escherichia coli* s-a evidențiat existența unui sistem de termosensori, similar în linii mari celor chemosensoriali. Este probabil că variațiile de temperatură sînt înregistrate de receptorul normal pentru L-serină, care ar suferi modificări conformaționale dependente de temperatură, ce transmit semnale diferite spre flagel (Maeda și Imae, 1979). Ipoteza se bazează pe faptul că mutantele incapabile să răspundă la L-serină nu sînt afectate de modificările de temperatură.

*Semnificația ecologică a termotaxiei* nu este încă definită.

## MAGNETOTAXIA

**„Omul nu este singurul organism viu care a inventat arta navigației magnetice"....**

R. P. Blakemore
R. B. Frankel

Blakemore (1975) a observat că unele bacterii acvatice sînt sensibile la influența cîmpului magnetic terestru: aflate în suspensie, se deplasează toate

în aceeași direcție și se acumulează pe latura de nord a preparatului, „fugind" de Polul Sud.

Bacteriile magnetotactice au fost găsite în lacuri cu apă dulce și sărată, mări, mlaștini, lacuri de munte, peșteri, izvoare termale, bazinele de decantare ale stațiilor de epurare a apelor uzate etc.

**Morfologie și structură internă.** Bacteriile magnetotactice au formă de coci *(Thiococcus magnetotacticus)*, vibrioni sau spirili.

Majoritatea studiilor au fost efectuate pe *Aquaspirillum magnetotacticum*, prezent în apele dulci, care se deplasează înainte sau înapoi folosind alternativ cei doi flageli, situați cîte unul la fiecare extremitate. În funcție de concentrația de Fe și $O_2$ din mediu, *A. magnetotacticum* conține un număr variabil (pînă la 20) de granulații (∅ 40—120 nm), de formă cubică sau octaedrică, electronoopace, numite *magnetosomi*, dispuse în unul sau în două șiruri paralele cu axul mare al celulei. Cei de la extremități sînt mai mici decît cei din interiorul lanțului. Magnetosomii se formează prin juxtapunerea unor cristale minuscule de magnetită ($Fe_3O_4$, puternic magnetizate, la care se adaugă Fe feros, oxid feric hidratat și ferihidrită (Frankel și Blakemore, 1989). Cantitatea de Fe reprezintă ~2% din greutatea uscată (~20 M/celulă).

Magnetosomii* sînt acoperiți de o membrană trilaminară, cu o structură chimică relativ complexă (proteine, acizi grași liberi, glicoproteine, fosfolipide) și cu funcții multiple: 1) rol specific în acumularea Fe; 2) furnizează situsurile de nucleare și precipitare a $Fe_3O_4$; 3) rol în reglarea dimensiunilor magnetosomilor, blocînd creșterea dincolo de anumite dimensiuni critice; 4) rol structural, de menținere în poziție fixă a particulelor de $Fe_3O_4$ în celulă; 5) reglarea pH și $E_h$.

**Bazele magnetotaxiei.** Alinierea granulațiilor de magnetită de-a lungul unui lanț sau a două lanțuri paralele în celulă realizează un fel de busolă biomagnetică a cărei forță este suficientă pentru a orienta deplasarea bacteriilor în mediile lichide de-a lungul liniilor de forță ale cîmpului magnetic terestru.

Bacteriile sînt propulsate de mișcarea de rotație a flagelului, din extremitatea opusă direcției de deplasare, ca toate bacteriile liber „înotătoare", dar, spre deosebire de *E. coli* și alte bacterii care reacționează chemotactic, ele prezintă mobilitate unidirecțională și nu-și schimbă direcția prin rostogoliri**.

*Orientarea deplasării magnetotactice.* Bacteriile magnetotactice se comportă ca dipoli magnetici de natură biologică. În funcție de orientarea dipolului magnetic bacterian au fost izolate două tipuri de bacterii cu direcții de deplasare diferite de-a lungul liniilor magnetice:

1) Bacteriile recoltate din sedimente acvatice situate în emisfera nordică (New England, S.U.A.) au tendința de orientare și deplasare unidirecțională spre nordul geografic (engl. „North-seeking pole bacteria"). Partea din „busolă" cu rol în orientare este situată la polul anterior al celulei, iar flagelul-motor, care le propulsează paralel cu direcția cîmpului magnetic, este situat posterior.

2) Bacteriile izolate din emisfera sudică (Tanzania și Christchurch — Noua Zeelandă) au predominant orientare spre sud („South-seeking pole") și se deplasează antiparalel cu direcția cîmpului.

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 358.

** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 366.

Cele două tipuri de bacterii sînt practic identice, numai că au polarități diferite. S-a emis ipoteza că în condiții naturale, apariția celor două tipuri de bacterii ar fi consecința intervenției componentei verticale a cîmpului geomagnetic. El ar selecționa polaritatea predominantă, favorizînd acele celule a căror polaritate le face să se orienteze în jos, spre sedimente, îndepărtîndu-le de suprafață, evitînd astfel efectul toxic pentru bacteriile anaerobe și microaerofile al apelor bogate în $O_2$.

Cîmpul geomagnetic este vertical și dirijat în sus la Polul Sud și respectiv vertical și dirijat în jos la Polul Nord*. În emisfera de nord, el este înclinat spre sol, iar în cea sudică spre cer. Valoarea absolută a înclinării magnetice crește progresiv de la ecuatorul geomagnetic spre unul din cei doi poli.

Figura 40 demonstrează că în emisfera nordică, bacteriile orientate spre nord se deplasează în jos, spre sedimente acvatice, în timp ce bacteriile de tip Sud urcă spre suprafața mediului, respectiv spre regiuni periculoase pentru supraviețuirea lor datorită concentrației mari de $O_2$.

În emisfera de sud situația este inversă.

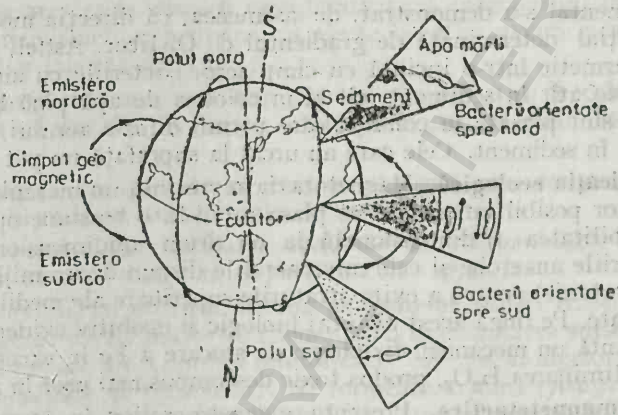



Fig. 40. — Deplasarea bacteriilor magnetotactice în cîmpul geomagnetic este determinată de polaritatea lor. Cele de tip „nord" înoată spre polul nord, cele de tip „sud" spre polul sud. Datorită înclinației cîmpului geomagnetic, bacteriile de tip „nord" vor înota „în jos" (spre sedimente) în emisfera nordică și „în sus" spre suprafața apei, în cea sudică. Bacteriile de tip „sud" se deplasează în sens opus. Deoarece deplasarea orientată în jos este avantajoasă pentru bacteriile microaerofile, care trăiesc în sedimente, bacteriile de tip „nord" vor predomina în emisfera nordică, iar cele de tip „sud" în cea sudică. La ecuatorul geomagnetic, cele două tipuri de bacterii coexistă și se deplasează în direcție orizontală (după Matsunaga, 1991).

La ecuatorul geomagnetic (Fortaleza — Brazilia), unde componenta verticală și liniile cîmpului orizontale sînt nule, cele două tipuri de bacterii coexistă. Ele se deplasează orizontal, evitînd astfel riscul ce decurge din ridicarea la suprafața apei (Frankel, 1981; Blakemore și Frankel, 1989). La acest nivel, criteriile de polaritate dispar.

* Polul magnetic al planetei nu coincide exact cu cel geografic.

Cercetările experimentale au validat rolul determinant al componentei verticale a cîmpului magnetic terestru în fixarea polarității populațiilor bacteriene în mediile naturale. Dacă un sediment care conține bacterii orientate spre nord este plasat în zona de acțiune a unui magnet care produce un cîmp cu o magnitudine de două ori mai mare și de sens opus celei a mediului natural, după cîteva săptămîni (respectiv după cîteva generații de bacterii), polaritatea predominantă este inversată și ele devin de „tip Sud". Probele plasate în cîmpul unui magnet care anulează componenta verticală a mediului conțin, după un interval similar, celule avînd ambele polarități.

Capacitatea de sinteză a magnetitei este controlată genetic, nu însă și polaritatea de reacție. Polaritatea unei bacterii magnetotactice se menține după diviziune la celulele-surori, pentru că lanțul magnetosomilor se scindează și fiecare celulă rezultată din diviziune moștenește cîțiva magnetosomi și odată cu aceasta polaritatea Nord sau Sud. Granulațiile nou sintetizate (cînd mediul conține minim 1 mg Fe/l) sînt depuse la extremitățile lanțului moștenit și se magnetizează la fel cu acesta, datorită interacțiunilor la care sînt expuse.

Experimental s-a demonstrat, de asemenea, că direcția mobilității este cel puțin parțial determinată de gradientul de $O_2$ liber. Astfel, cînd probele sînt închise ermetic într-o incintă cu cîmp zero, bacteriile cu ambele polarități sînt găsite atît în sediment, cît și în coloana de apă pînă la suprafață. Cînd probele sînt plasate în condiții care permit difuzia aerului, bacteriile se găsesc numai în sediment. Cele care au urcat la suprafață nu pot supraviețui.

**Semnificația ecologică.** Magnetotaxia reprezintă un mecanism care conferă bacteriilor posibilitatea de a se plasa rapid la o tensiune optimă de $O_2$, reducînd mobilitatea tridimensională la un drum unidimensional. În felul acesta, bacteriile anaerobe și cele microaerofile dispun de un mijloc adițional (pe lîngă aerotaxie) pentru a evita straturile superioare ale mediilor acvatice, bogat oxigenate. Pe lîngă acest avantaj biologic și evolutiv evident, magnetosomia reprezintă un mecanism fiziologic de stocare a Fe în exces și, în plus, favorizează eliminarea $H_2O_2$, produs toxic descompus mai ușor în prezența Fe.

**Algele magnetotactice.** Prezența magnetosomilor în formă de dinte, glonț, săgeată sau cui a fost evidențiată și la unele alge euglenoide aclorofiliene *(Anisonema platysomum)*, izolate din sedimente acvatice în Brazilia. Momentul magnetic total al unei celule algale este de ~1000 de ori mai mare decît cel al bacteriilor.

**Implicații paleomagnetice ale magnetitei bacteriene.** Peterson și colab. (1986) au găsit lanțuri de magnetosomi fosile în sedimente din fundul Oceanului Atlantic de Sud, datînd de 5—50 milioane de ani, pe care le-a identificat pe baza formei, mărimii și aranjamentului particulelor de $Fe_3O_4$. Ei consideră că după moartea bacteriilor magnetotactice, magnetosomii rămîn în sedimente, contribuind la magnetizarea remanentă a sedimentelor anaerobe.

Magnetita este prezentă și la unele organisme animale (fluturi, albine, moluște, porumbei, delfini), la care însă nu s-a demonstrat, pînă în prezent, fără echivoc, eventuala implicare în răspunsul acestora la geomagnetism (Frankel și Blakemore, 1989).

## SEMNIFICAȚIA ECOLOGICĂ A DIFERITELOR TAXII

Numeroase fapte de observație și cercetări de laborator pledează pentru un rol important al diferitelor taxii în ecologia comunităților de microorganisme. Cele mai multe date se referă la reacțiile chemotactice, care, de altfel, sînt și cele mai frecvent întîlnite.

Ele creează un important avantaj selectiv într-o gamă largă de activități, ca: în localizarea hranei, simbioză, patogenitate și prădare, sexualitate, agregare și diferențiere etc. În acest context, au fost evidențiate o serie de situații, în care taxiile au implicații majore ca, de exemplu:

1) tendința de deplasare preferențială spre teritorii cu condiții fizico-chimice mai favorabile (iluminare, temperatură, $O_2$, substraturi nutritive sau surse de energie mai avantajoase);

2) evitarea unor condiții de mediu nefavorabile (lipsa de nutrienți, prezența de agenți toxici etc.);

3) deplasarea spre situsuri care favorizează interacțiuni între microorganisme și organismele superioare, cu efecte benefice asupra acestora (fixare $N_2$) sau nocive (agenți patogeni);

4) dirijarea microorganismelor spre un anumit tip de celulă-țintă sau spre un situs celular definit pentru interacțiuni parazit/pradă sau de patogenitate;

5) formarea de agregate de microorganisme, mai rezistente decît formele libere, în condiții nefavorabile de mediu.

Este evident că în habitatele naturale, microorganismele mobile beneficiază de un avantaj major în raport cu cele imobile.

**Rolul taxiilor în nutriția microorganismelor.** Adler, Hazelbaum și Dahl (1973) au sugerat un rol major al chemotaxiei în detectarea surselor de C și N în mediile naturale. Un exemplu semnificativ este cel al algelor marine *(Skeletonema; Dunaliella* și *Cyclotella)*. Se formează o zonă *(ficosfera*, după Bell și Mitchel ,1972) în care creșterea bacteriilor atrase chemotactic este stimulată de produșii algali extracelulari.

Răspunsul este maxim în culturile algale vechi, iar în condiții naturale (în mediile marine și estuarine) are o importanță majoră în fazele tardive ale „înfloririlor" algale. Concentrația-prag a produșilor algali care stimulează chemotaxia este foarte mică ($10^{-4} - 10^{-5}$ M).

Fenomenul demonstrează rolul chemotaxiei în reținerea bacteriilor în apropierea unor surse de materiale organice nutritive, după ce au ajuns întîmplător în apropierea lor.

Fenomene similare au fost semnalate și în cazul unor interacțiuni cu caracter de antagonism, considerate de Chet și Mitchell ca interacțiuni prădător/pradă. Astfel, o bacterie mobilă *(Pseudomonas* sp.) care atacă fungii *(Pythium debaryanum)* este atrasă de substanțele eliberate (celuloza și oligomerii ei) din peretele fungic. De asemenea, o bacterie antagonistă neidentificată care atacă alga *Skeletonema costatum* este atrasă selectiv de exsudatul algal specific.

Fenomenul este semnificativ în ecosistemele în care organismele-pradă sînt puțin numeroase.

## HOMOTAXIA

Spre deosebire de taxiile obișnuite (chemo-, foto-, aerotaxie etc.), care reprezintă răspunsuri la un stimul exogen, *homotaxia* (Brock, 1966) este fenomenul de migrare a celulelor individuale ale unei specii sub acțiunea unor factori intrinseci, generați de ele însele.

Fenomenul a fost studiat mai ales la mixomicete, microorganisme cu o poziție sistematică mult timp controversată, datorită ciclului lor de viață neobișnuit. Ambiguitatea decurge din faptul că forma lor vegetativă este reprezentată de o masă amiboidă, în timp ce „corpii fructiferi" („Fruiting body") produc spori cu perete celular ca fungii.

Au fost descrise două categorii de mixomicete:

1) *acelulare* („Acellular slime molds") ca: *Didymium avoideum, D. iridis, Physarum polycephalum, Stemonitis oxifera* etc., ale căror forme vegetative sînt reprezentate de mase de citoplasmă cu mărime și formă nedefinite;

2) *celulare* („Cellular slime molds"), cu forme vegetative celulare de tip amibian și cu un ciclu de viață relativ complicat *(Dictyostelium discoideum)*.

Modelul experimental folosit curent pentru studiul fenomenului de homotaxie este reprezentat de *D. discoideum*, considerat, în același timp, ca un model ideal pentru studiul comunicărilor intercelulare în general. Ciclul său de viață are trei faze distincte (fig. 41):

1) *Faza de creștere vegetativă* are ca punct de plecare un spor, care germinează sub influența unor activatori/stimulatori eliberați de bacteriile prezente în mediu. Rezultă o celulă amiboidă liberă, care înglobează un număr mare de bacterii (~ 1000 între două diviziuni), fiind atrasă de acidul folic din structura acestora (Rowbury și Armitage-King, 1984). Ambele cresc și se divid binar cît timp găsesc bacterii în mediu.

2) *Faza „socială", de agregare*, este separată de cea precedentă printr-o interfază cu durata variabilă (6—12 ore) în funcție de temperatură, lumină și densitatea celulară. În cursul ei se produc mișcări cu caracter discontinuu, care creează adevărate unde de celule, ce migrează, în valuri succesive, spre regiunea centrală. La început, aceste mișcări se produc la intervale de 10 minute, apoi din ce în ce mai frecvent (la ~ 2—3 minute). Faza de agregare este controlată genetic și implică participarea a aproximativ 50 de gene.

3) *Faza de dezvoltare morfogenetică*. La sfîrșitul fazei de agregare, amibele „înfometate" se asociază pentru a forma un pseudoplasmodiu („Slug" sau „Grex") asemănător ca aspect și mod de deplasare cu un limax. În structura acestuia, celulele își pierd o parte din individualitate, dar nu fuzionează, formînd agregate de 100—100 000 de celule. Pseudoplasmodiul manifestă foto-, termo- și chemotaxie (Fisher și colab., 1980). El se deplasează pe suprafața mediului mai multe zile, ca rezultat al activității colective a amibelor componente. Ulterior, plasmodiul formează structuri verticale mobile, ridicate deasupra mediului („Standing slug"), în formă de deget, care cad pe suprafața mediului și se deplasează cîteva ore, trecînd printr-un stadiu final, asemănător cu o pălărie mexicană.

Faza finală de construcție a corpului fructifer („Culmination") este rezultatul stopării procesului de migrare și al agregării cîtorva sute de celule amiboide, care alcătuiesc un peduncul, ca un „picior", la extremitatea căruia se formează sporii cu înveliș tristratificat, de regulă, inclavați în mucus (fig. 42).

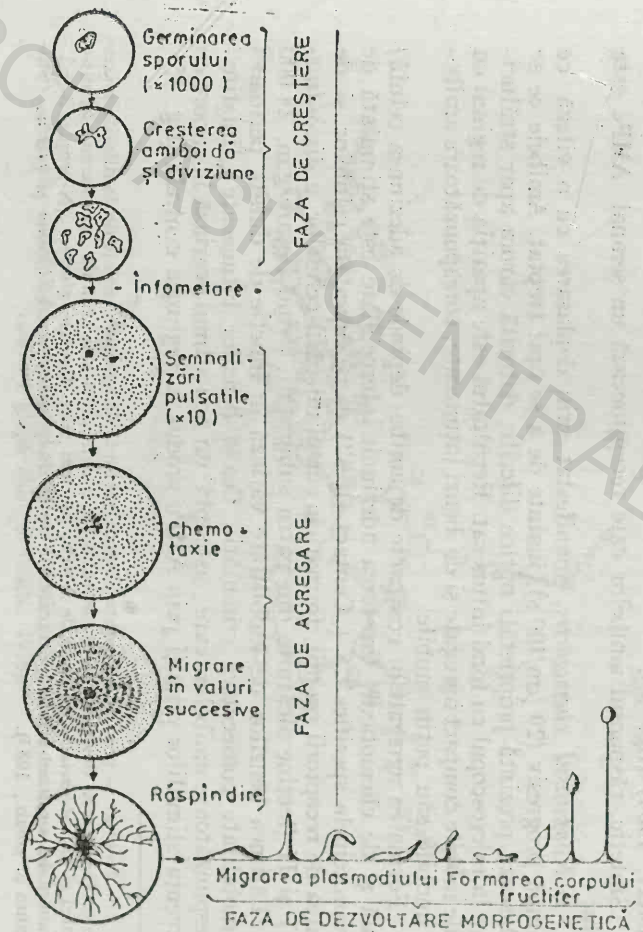



Fig. 41. — Ciclul de viață la *Dictyostelium discoideum* evidențiind fazele de creștere, de agregare și de dezvoltare morfogenetică (după Newell, 1976).

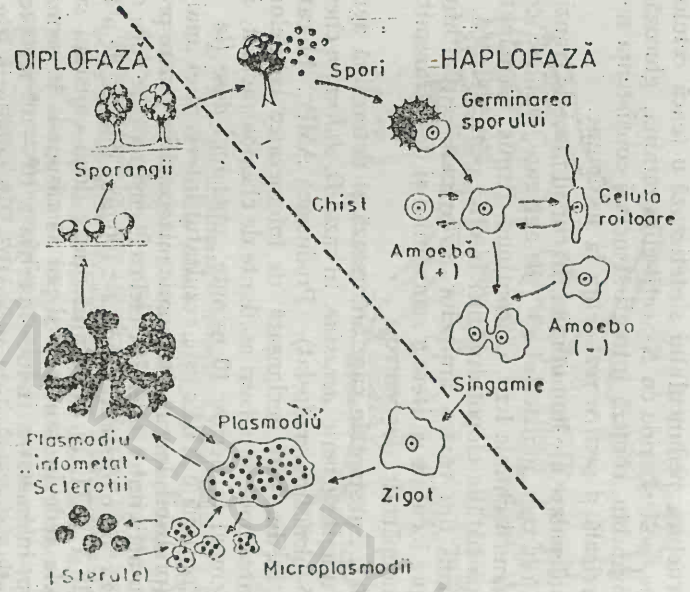



Fig. 42. — Reprezentarea schematică a ciclului de viață la *Physarum polycephalum* (după Wüttermann, 1973).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Celulele din structura pedunculului sintetizează o teacă celulozică. Ea mai conține proteine, polizaharide cu N-acetil-glucozamină, glucoză și manoză, astfel că, în ansamblu, conferă întregii structuri consistența necesară pentru menținerea verticală și pentru rezistența la uscăciune.

**Bazele moleculare ale homotaxiei.** În cursul fazei de tranziție de la structura unicelulară la cea „multicelulară", de agregare, celulele comunică între ele printr-un semnal chimic lent, discontinuu, ritmic, asemănat metaforic de Newill (1976) cu bătăile clopotului unei biserici pentru slujbă. El determină un dublu răspuns din partea amibelor „evlavioase" („Faithful amoebae"): de deplasare spre locul de emitere a semnalului și de retransmitere a acestuia altor amibe îndepărtate de centru.

*Acrasinele**. Substanțele care amorsează și determină agregarea mixomicetelor, sînt numite generic *acrasine*. În cazul *D. didinium* chemoatractantul este AMPc (3,5-adenozinmonofosfat). Producerea AMPc, blocată în prezența nutrienților în mediu, este declanșată de înfometarea celulelor. Ea este urmată de eliberarea unor impulsuri oscilante de chemoatractant, inițial cu frecvența de un semnal la fiecare 10 minute, apoi mai dese (la 2—3 minute). Eliberarea discontinuă a AMPc este rezultatul intervenției unui oscilator metabolic intern (probabil, lanțul citocromic mitocondrial), care produce o modificare ciclică în activitatea adenilat ciclazei, enzima care face sinteza AMPc. Acesta difuzează pe o distanță mică ($<100$ μm) înainte de a fi degradat de fosfodiesterazele I și II, în intervalul dintre două emisiuni succesive. Prin aceasta, celulele redevin sensibile și pot să răspundă la semnalul următor. În același timp, înfometarea induce apariția a $10^5$—$10^6$ receptori proteici de AMPc pe suprafața fiecărei celule agregative din populație (fig. 43). Interacțiunea AMPc/receptor determină deplasarea celulelor spre sursa de chemoatractant, prin inducția polarizată a formării pseudopodelor (Konija și van Haastert, 1984) (fig. 44).

Sintetic, răspunsul amibelor care recepționează un semnal AMPc este dublu:

1) *Răspunsul chemotactic*, manifestat prin deplasarea cu o viteză ce diminuă progresiv (20 μm/100 s), înainte de a se opri treptat. Amibele ce se deplasează prezintă proprietăți optice diferite, datorită cărora apar strălucitoare la microscopul cu fond întunecat. Rezultatul este apariția de regiuni cu celule mobile compact agregate și de benzi întunecate, corespunzătoare amibelor imobile sau puțin mobile.

Formarea agregatelor compacte de amibe depinde de adeziunea celulă/celulă și de chemotaxie. Creșterea adeziunii intercelulare este stimulată de glicoproteinele specifice *CS* („Contact sites") de pe suprafața celulelor și de legarea de receptorii proprii, formați în cursul mișcării celulelor, a *discoidinelor* I și II (lectine alcătuite din patru subunități, avînd fiecare g.m. 24 000 dal. Lățimea benzilor de mobilitate variază în funcție de durata perioadei de mobilitate consecutivă stimulării. Cea a benzilor întunecate „liniștite" corespunzătoare amibelor, care „așteaptă' un nou stimul, variază în raport cu frecvența stimulilor primiți prin AMPc produs în regiunea centrală (fig. 45).

---

* *Acrasine* — grup de substanțe chemoatractante de agregare izolate de la diferite mixomicete. Denumirea derivă de la capacitatea de a determina sau stimula agregarea anumitor membri ai ord. *Acrasiales*. În afară de AMPc, au mai fost descrise *glorina* (N-propionil-γ-L-glutaminoil-L-ornitinil-β-lactametil (esterul) de la *Polyspondylium violaceum* și *pterina* (Shimomura și colab., 1983).

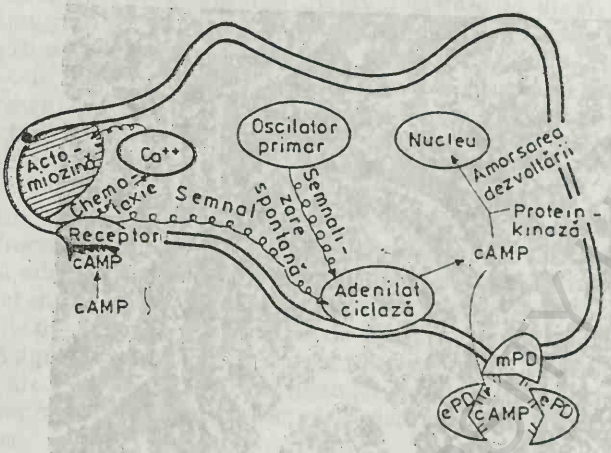



Fig. 43. — Reprezentarea schematică a mecanismului de producere a semnalului pulsatil de transmitere, chemotaxie și amorsarea dezvoltării. Oscilatorul primar stimulează periodic adenilatciclaza să producă AMPc, care este eliberat și distrus rapid de fosfodiesterazele extracelulare (ePD) și legate de membrane (mPD). În cele din urmă, aceste impulsuri pot activa proteinkinazele, care amorsează procesele de dezvoltare în nucleu. Înainte ca AMPc să fie distrus, o parte este legat de receptorii amibelor învecinate. Acestea induc chemotaxie (probabil prin eliberare de $Ca^{2+}$) și producere de noi impulsuri de AMPc (semnalul de agregare) prin activarea adenilat ciclazei (după Newell, 1976).

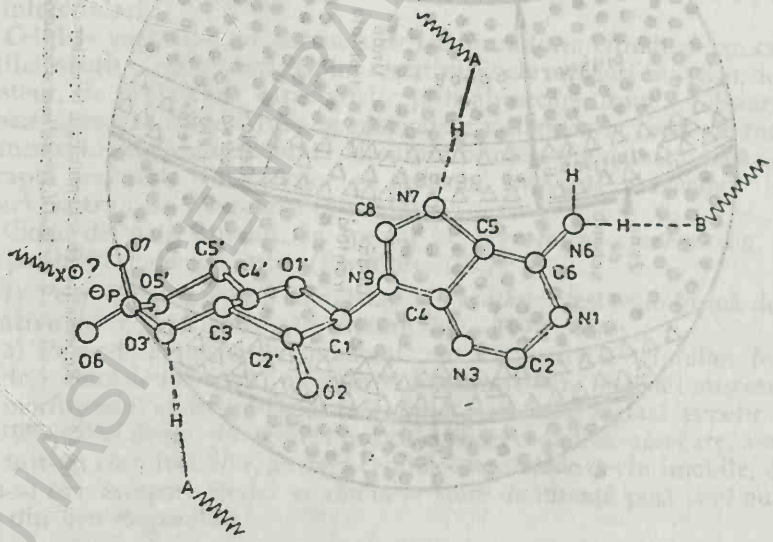



Fig. 44. — Model de interacțiune receptor — AMP ciclic la *Dictyostelium discoideum* (după Mato și colab., 1978).

BCU IAȘI CENTRAL LIBRARY

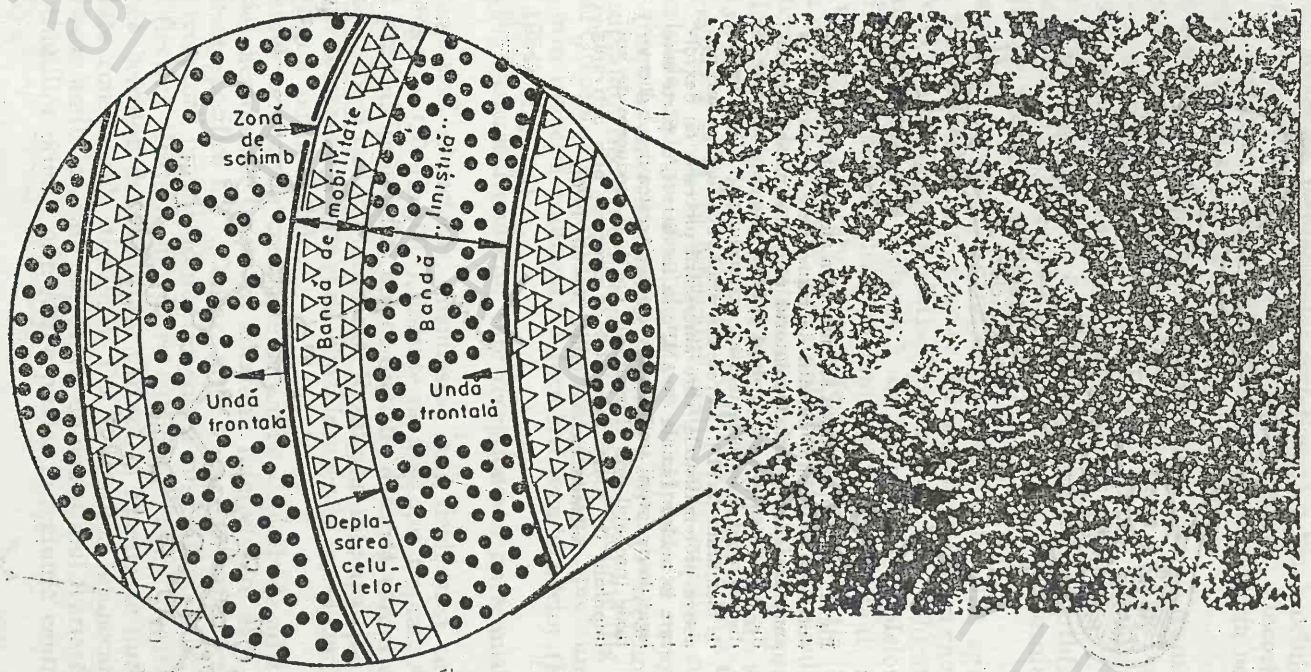



Fig. 45. — Reprezentarea schematică a benzilor alternative luminoase și întunecate, determinate de migrarea stadiului de amoebă de la *Dictyostelium discoideum* (după examinare în cîmp întunecat de Newell, 1976).

BCU IASI
LIBRARY

2) *Răspunsul de retransmitere* („Relay response"): după 12—15 s de la primirea stimulului AMPc, amibele stimulate devin ele însele producătoare de AMPc și emit semnale chemoatractante, la intervale de ~ 1 minut, care difuzează spre cele mai îndepărtate celule. Amibele situate în regiunile anterioare (spre centru) nu reacționează la aceste semnale deoarece se găsesc în perioada refractară la retransmiterea („The relay refractory period") produsă de stimulul anterior (Konijn și van Haastern, 1984; Rowbury și Armitage-King, 1984).

Mobilitatea amibelor este asigurată de actomiozina contractilă în prezența $Ca^{2+}$. Procesul implică participarea guanizin-5-monofosfat (GMPc). În ~ 10 s după adăugarea AMPc, nivelul GMPc este cel mai ridicat și revine la nivelul inițial după 30 s. Concentrația enzimei care produce GMPc, guanilciclaza, crește de 6—10 ori în cursul fazei de diferențiere a celulelor vegetative pentru a deveni agregative. GMPc care este, la rîndul său, degradat de GMPc-fosfodiesterază are funcția de al doilea mesager și participă la fosforilarea proteinelor specifice, necesare pentru mișcarea orientată prin acțiunea proteinkinazelor specifice.

### Homotaxia la bacterii

Homotaxia este implicată și în formarea rozetelor de gonidii de *Leucothrix* și *Thiothrix*. Agregarea are loc chiar în absența materialului polizaharidic, de „crampon", care este format ulterior și are rolul de a menține celulele din rozetă (Brock, 1966). Inițierea formării rozetelor este controlată de înfometare, iar acumularea de gaze rezultate din metabolism ($CO_2$ și altele), în centrul grupului de celule, ar fi implicată în modificările morfogenetice.

**Homotaxia la mixobacterii.** Micobacteriile* sînt procariote care prezintă un ciclu de viață cuprinzînd secvențe de dezvoltare complexă, implicînd morfogeneză celulară și colonială, asociate cu procese rudimentare de comunicare intercelulară.

Celulele vegetative au forma unor bacili uniform cilindrici sau cu extremitățile ascuțite, neflagelați, Gram-negativi, inclavați într-un strat de mucus consistent. Se deplasează caracteristic prin alunecare-„roire" („Swarmers"). Formează pe agar colonii care se răspîndesc radiar de la locul de inoculare. Marginea coloniei este neregulată, deoarece celulele din această zonă se mișcă mai rapid decît cele din interior, se desprind frecvent „alunecînd" în afara coloniei pentru a se reîntoarce în corpul ei.

Ciclul de viață studiat, în special la *Myxococcus xanthus* (fig. 46) are două posibilități de evoluție: (Dworkin, 1973):

1) Pe mediile nutritive complexe, *M. xanthus* crește sub formă de celule vegetative ce se divid binar la fiecare 200—270 minute.

2) Pe mediile lipsite de un anumit nutrient specific (triptofan, fenil alanină etc.), celulele intră într-un ciclu de dezvoltare care include: mișcare orientată, morfogeneză multicelulară, diferențiere celulară reglată genetic (Shimkets, 1989). Zeci de mii de celule alunecă spre un centru de agregare, asamblîndu-se într-un corp fructifer, în care celulele vegetative devin imobile, diferențiindu-se în mixospori sferici ce rămîn în stare de latență pînă cînd nutrienții devin din nou disponibili.

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 393.

**Bazele moleculare ale homotaxiei mixobacteriilor.** După Shimkets (1989), mobilitatea prin alunecare este cuplată cu două sisteme comportamentale controlate multigenic și notate „A" („Adventurous behaviour") și „S" („Social behaviour"). Sistemul „A" are probabil > 22 de locusuri genetice, iar „S" peste 100 de locusuri.

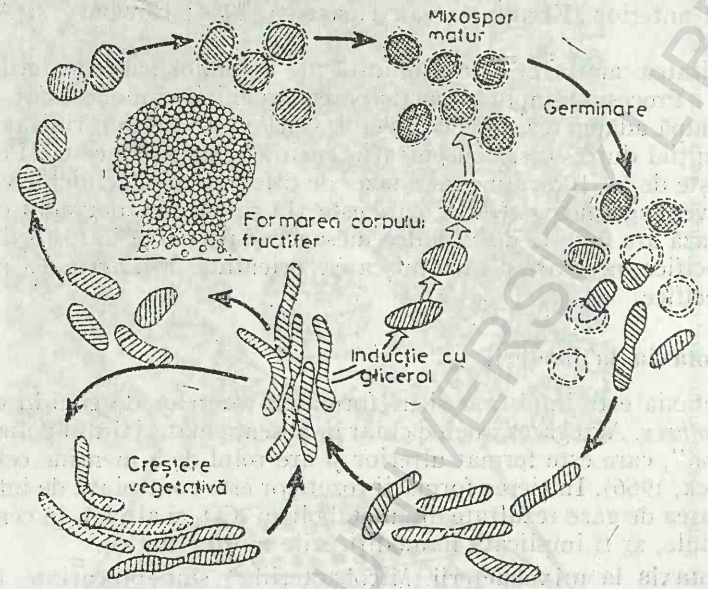



Fig. 46. — Ciclul de evoluție la *Myxococcus xanthus* (după Dworkin, 1973).

Mixobacteriile $A^+S^+$ asigură migrarea celulelor individuale sau, în funcție de condițiile de mediu, comportamentul „social", de grupare de la zeci la mii de celule.

Celulele $A^-S^+$ și-au pierdut mobilitatea individuală, dar se pot deplasa în grupuri, deoarece contactul intercelular pare să fie esențial pentru deplasare.

Invers, celulele $A^+S^-$ sînt necoezive, se mișcă individual, nu însă și „social".

În sfîrșit, celulele $A^-S^-$ sînt imobile în ambele ipostaze. Agregarea este asociată cu apariția unor fibrile groase cu ∅ de 50 nm, care acoperă suprafața celulelor și se extind în afara ei. Ele sînt absente la mutantele incapabile de comportament social.

*Rolul suprafeței celulare* în acest comportament este esențial.

Mutantele $S^-$ sînt necoezive, nu au pili, nici fibrile (coezine) și nici receptori pentru roșu de Congo. Suprafața celulară a acestora studiată cu ajutorul marcării radioactive și al anticorpilor monoclonali e diferită net de cea a variantelor $S^+$.

Exprimarea comportamentului social este condiționată de creșterea concentrației locale a coezinelor, în timp ce mobilitatea individuală („Adventurous") este determinată de contracararea forțelor coezive, prin represarea sintezei de coezine sau inhibarea funcției lor.

**Ecologie.** Mixobacteriile sînt răspîndite în sol, pe materiile vegetale pe cale de descompunere. Rolul lor în natură este corelat cu proprietatea de a hidroliza macromoleculele insolubile. Ele reprezintă grupul de organisme cu tipul de comportament și ciclul de viață cel mai complex dintre toate procariotele. Deși celulele lor se comportă, în esență, independent unele de altele, ele prezintă, pe lîngă o mobilitate de tip puțin obișnuit, și un ciclu de viață care implică morfogeneză, diferențiere celulară și colonială, cît și unele fenomene de comunicare intercelulară controlate genetic.

Acest comportament corespunde unui tip rudimentar de organizare „multicelulară" sau, mai corect, de *asociere comunitară*, reprezentînd, după Dworkin (1976), cea mai simplă și cea mai primitivă *comunitate organizată*. Asocierea caracterizează toate stadiile de viață: celulele se deplasează adesea în „roiuri" coordonate, care pulsează ritmic sau se mișcă coordonat.

**Semnificația biologică generală a fenomenelor de homotaxie.** Homotaxia este un fenomen populațional rezultat al interacțiunii unor celule genetic identice dintr-o populație de microorganisme. Avantajul major al fenomenelor de agregare în natură decurge din faptul că agregatele pot dobîndi funcții pe care celulele individuale nu le pot efectua. În același timp, prin reducerea numărului de unități independente active, agregarea reduce eficiența proceselor de selecție și implicit adaptarea organismelor la modificările mediului, precum și capacitatea de dispersare în medii noi.

După Newell (1976), agregarea și unicelularitatea sînt stări competitive în viața microorganismelor.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# INFLUENȚA INTERFEȚELOR ASUPRA MICROORGANISMELOR. BIOFILMELE MICROBIENE

În mediile naturale, în condiții fizico-chimice adecvate, orice suprafață expusă unor soluții apoase, care conțin mici cantități de nutrienți este acoperită de o peliculă de microorganisme sub forma unui strat monocelular, a unor microcolonii sau biofilme.

Încă din anul 1913, Söhnung a semnalat faptul că prezența unei faze solide poate influența evoluția unei diversități de procese bacteriene, ca, de exemplu, fixarea biologică a N, nitrificarea, denitrificarea, oxidarea etanolului la acid acetic etc.

Fenomenul a fost confirmat de numeroase observații care au evidențiat acumularea și chiar multiplicarea microorganismelor la interfața reprezentată de faza în care se găsesc microorganismele și suprafețele solide sau de altă natură.

În termeni fizico-chimici, interfața este o graniță între două faze, ale unui sistem heterogen.

În natură există o gamă largă de interfețe de tipul lichid — lichid, lichid — gaze, solid — lichid, solid — gaze. Datorită proprietăților lor fizice deosebite, diferitele interfețe influențează în mod deosebit microorganismele. Ele au însă o proprietate comună: aceea de a colecta și concentra particulele, inclusiv microorganismele.

**Interfața lichid — lichid**, cu rol deosebit în sistemele biologice, este importantă și în natură. Microorganismele acumulate la interfața ulei/apă sînt deosebit de importante în degradarea țițeiului, care poluează mediul marin. Raportat la o anumită cantitate de țiței, efectul este cu atît mai important cu cît picăturile sînt mai mici și, ca urmare, atît suprafața de acțiune, cît și numărul bacteriilor sînt mai mari.

**Interfața aer — solid** este una dintre cele mai răspîndite și cu formele cele mai diferite de la fitoplan la suprafața clădirilor din piatră. Activitatea microorganismelor necesită prezența unei anumite cantități de apă.

**Interfața solid — lichid** corespunde situației în care o suprafață solidă este expusă unei suspensii apoase de microorganisme. Interacțiunea are un mecanism mai complex, deoarece, adesea, cele două suprafețe care interacționează (de exemplu, bacterii/substrat) sînt electronegative. După Röle (1976), cationii bivalenți pot acționa ca o punte de legătură.

**Interfața solid — lichid — aer** este tipică, după Ellwood și colab. (1982), în cazul „picioarelor" de susținere ale platformelor marine pentru extracția petrolului. Particulele bacteriene, avînd densități apropiate de cele ale apei, tind să se adune la interfața lichid — aer. Dacă întîlnesc o suprafață solidă, ele au tendința să se acumuleze la interfața solid/lichid/aer.

## MECANISMELE ADEZIUNII BACTERIILOR

Bacteriile pot fi considerate particule coloidale și, ca urmare, adeziunea lor la diferite substraturi a fost studiată experimental ca un fenomen fizico-chimic, aplicînd, deci, principiile chimiei coloizilor. Evident că bacteriile nu sînt particule coloidale inerte și, în consecință, suprafețele și caracteristicile lor se pot schimba în funcție de modificările condițiilor de mediu, într-un fel neîntîlnit în chimia coloizilor (van Loosdrecht, 1990). Fenomenul a fost studiat cel mai mult în condițiile colonizării unei interfețe solid/lichid.

Ca și cele mai multe suprafețe naturale, suprafața bacteriilor este, de regulă, încărcată negativ și poate avea diferite grade de hidrofobicitate.

În funcție de natura substratului, adeziunea bacteriilor se poate face pe două căi: 1) prin fenomene fizico-chimice și 2) pe baza unor fenomene de recunoaștere moleculară, prin contact direct, utilizînd structuri specifice de suprafață.

Fenomenul decurge în patru etape (van Loosdrecht, 1990):

1) **Etapa de transport**, respectiv de deplasare a microorganismelor din mediu la suprafața substratului se poate realiza prin trei mecanisme diferite:

a) *Deplasarea prin difuziune* este consecința mișcării browniene a celulelor bacteriene. Asigurînd o deplasare lentă și contacte aleatorii cu diferite suprafețe este activă în condiții de mediu liniștit, ca și în cursul proceselor de sedimentare, în care poate reprezenta singurul mod de contact al microorganismelor cu diferite substraturi.

b) *Deplasarea prin curenți de convecție* asociată cu circulația lichidului în care sînt suspendate, poate asigura un transport cu cîteva ordine de mărime mai rapid decît cel precedent.

c) *Mișcarea activă*, cea mai rapidă, poate duce la contacte întîmplătoare sau orientate chimiotactic în cazul existenței unui gradient de contracții în regiunea interfacială.

2) **Etapa de adeziune inițială.** În condiții naturale orice suprafață inițial „curată" este acoperită în scurt timp de molecule adsorbite, în general, de natură proteică. Încă din faza în care se găsesc la oarecare distanță de substrat, microorganismele sînt expuse forțelor generale fizico-chimice. Adeziunea este inițial reversibilă în sensul unei depuneri pe suprafața-suport cu menținerea în continuare a mișcării browniene și flagelare, și cu posibilitatea de îndepărtare prin agitare ușoară sau chiar prin propria lor mobilitate (fig. 47).

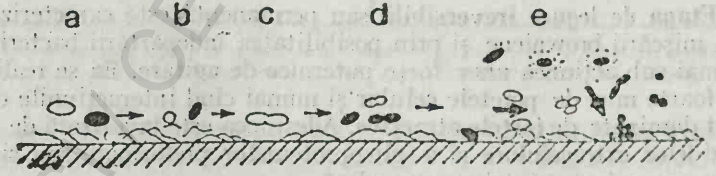



Fig. 47. — Legarea microorganismelor și formarea biofilmului evoluează într-o serie de etape. Inițial, bacteriile se asociază reversibil cu ajutorul polimerilor de suprafață (a), apoi aderă ireversibil (b), se divid (c) și produc microcolonii (d). Biofilmul poate crește și prin legarea directă a celulelor din mediu (e) (după Blenkinsopp și Costerton, 1991).

Un rol important în procesele de adeziune au atît interacțiunile van der Waals-London, care sînt, de regulă, atractive, tensiunea interfacială, legăturile covalente, cît și forțele repulsive electrostatice. În mediile naturale, dato-

rită structurii învelișului celular atît bacteriile Gram-negative, cît și cele Gram-pozitive sînt încărcate electronegativ. Energia potențială rezultată din interacțiunea lor variabilă și în funcție de concentrația electroliților determină comportarea bacteriilor în raport cu substratul (fig. 48).

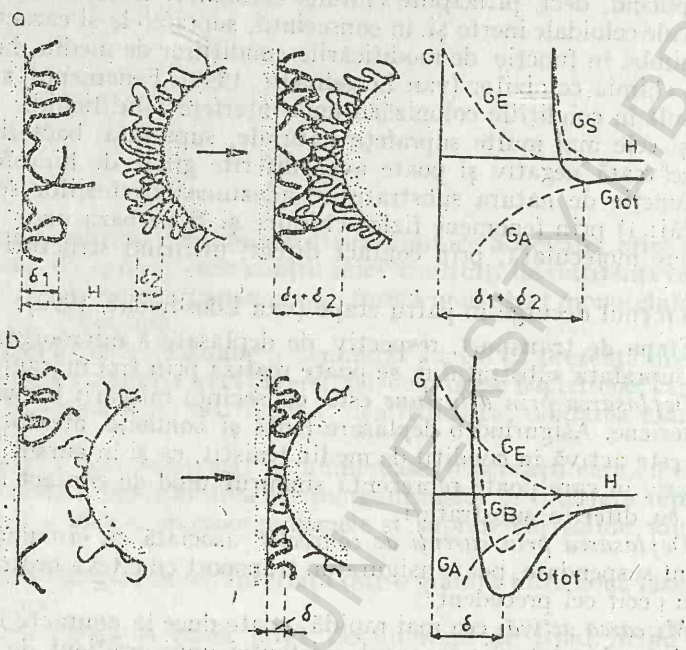



Fig. 48. — Interacțiunea de respingere între suprafețe acoperite cu polimeri încărcați similar (a) și interacțiunea de legare prin punți de polimeri între suprafețe încărcate asemănător (b): $C_A$ = interacțiune Van der Waals; $G_E$ = interacțiune electrostatică; $G_S$ = interacțiune sterică; $G_B$ = interacțiune prin formare de punți („bridging"); $G_{tot.}$ = interacțiune totală; H = distanța între două suprafețe; $\delta$ = grosimea medie a stratului de polimer. Polimerii legați inițial de suprafața solidă sînt reprezentați cu o linie mai groasă (după van Loosdrecht, 1990).

3) **Etapa de legare ireversibilă** sau permanentă este caracterizată prin încetarea mișcării browniene și prin posibilitatea îndepărtării bacteriilor aderente numai sub acțiunea unor forțe puternice de agitare. Ea se realizează la distanțe foarte mici de peretele celular și numai cînd interacțiunile de la distanță sînt dominate de forțele atractive. Adeziunea este favorizată de prezența polizaharidelor extracelulare și a glicoproteinelor preformate sau sintetizate *de novo* pe suprafața celulelor care aderă.

Hamada (1977), lucrînd cu *Streptococcus mutans*, a demonstrat că adeziunea acestuia de suprafețe de sticlă necesită sinteza activă de glucan nou, chiar dacă aceasta există și mai înainte. Deci, în acest caz, adeziunea necesită activitate metabolică celulară, sinteză de proteine și consum de energie. Fenomenul explică de ce bacteriile în faza exponențială de creștere aderă mai repede de substraturi decît celulele din faza staționară, bătrîne sau moarte.

Există și cazuri particulare, cum este cel al bacteriei *Agrobacterium tumefaciens*, care după ce aderă *in vitro* de celulele de morcov produce fibrile de celuloză, care o ancorează de suprafața acestora (Matthyse, Holmes și Gurlitz, 1987). Adeziunea este, de asemenea, favorizată de prezența unor apendice filamentoase (fimbrii, flageli), care interacționează cu receptorii specifici, sau a unor structuri speciale de fixare de tipul „crampoanelor" („Holdfast") de la *Caulobacter*.

Costerton și colab. (1978) au evidențiat semnificația glicocalixului*, rețea de fibrile sintetizate pericelular numai în condiții naturale. El formează o zonă importantă de concentrare prin adsorbție a nutrienților esențiali, mai ales în medii cu concentrații suboptimale, acționînd din punct de vedere funcțional asemănător rășinilor schimbătoare de ioni.

4) **Etapa de colonizare.** După legarea fermă, bacteriile încep să crească și să se multiplice rapid. Celulele legate ireversibil de substrat, dar nu și între ele, formează un strat continuu monocelular care acoperă toată suprafața expusă a substratului. Celulele legate și de substrat și între ele formează microcolonii și biofilme (fig. 49).

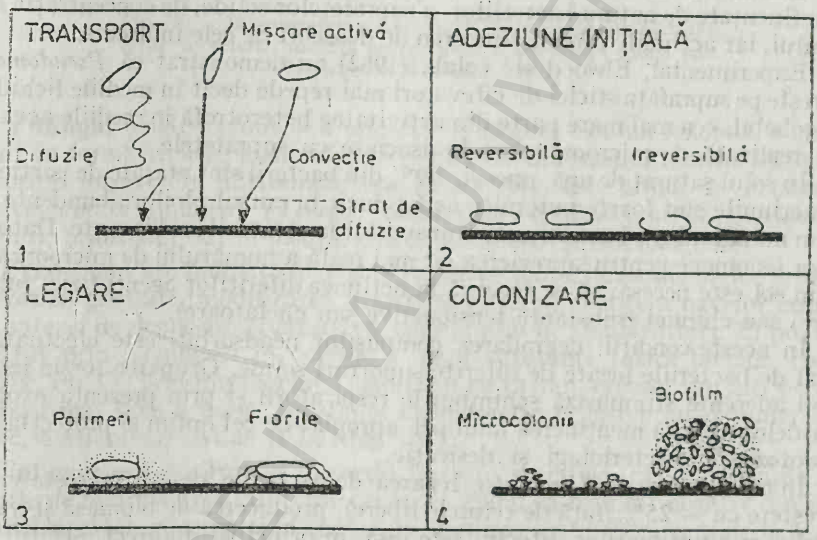



Fig. 49. — Reprezentarea schematică a etapelor succesive ale colonizării suprafețelor de către microorganisme (după van Loosdrecht și colab., 1990).

Ulterior, biofilmele rezultate din creșterea pluristratificată a bacteriilor pot fi colonizate și de alte specii incapabile *per se* să colonizeze suprafețe străine, care pot contribui la organizarea mai complexă a biofilmului. Se adaugă, uneori, cantități importante de polimeri specifici cu structura reticulată sau fibrilară, care ancorează suplimentar celulele de substrat și unele de altele (Harris și Mitchell, 1973; van Loosdrecht, 1990). Cînd biofilmul devine suficient de gros, straturile profunde devin anoxice și conțin predominant specii anaerobe. Mai devreme sau mai tîrziu, cel puțin celulele de la baza sistemului,

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 362.

devin înfometate și pot să moară sau să se lizeze. Anoxia, moartea multor celule și producerea de gaze pot destabiliza biofilmul, determinînd detașarea și desprinderea lui de suprafețele solide.

Creșterea poate fi reluată, avînd un caracter ciclic.

## PARTICULARITĂȚILE ACTIVITĂȚII MICROORGANISMELOR ADERENTE DE SUBSTRATE

Una din primele observații privind activitatea deosebită a bacteriilor aderente de diferite substraturi aparține lui Zobell și Anderson (1936): numărul bacteriilor prezente în apa de mare stocată și viteza de mineralizare a C organic sînt proporționale cu raportul dintre suprafața și volumul containerului folosit.

Wardell, Brown și Flannigan (1983) citează mai multe lucrări ce demonstrează că bacteriile aderente pot prezenta o creștere mai intensă sau o viteză metabolică mai mare decît cea a populațiilor aflate în suspensie.

În condiții naturale, rezultatele sînt mai greu de interpretat deoarece sînt influențate de natura bacteriilor, a suprafețelor solide, de concentrația substratului, iar acțiunile directe sînt greu de deosebit de cele indirecte.

Experimental, Elwood și colab. (1982) au demonstrat că *Pseudomonas* sp. crește pe suprafața sticlei de cîteva ori mai repede decît în mediile lichide și că, probabil, cea mai mare parte din activitatea heterotrofă în mediile acvatice ar fi realizată de microorganismele asociate cu suprafețele.

În solul saturat de apă, uneori, 99% din bacterii sînt atașate de particule. Interacțiunile sînt foarte puternice astfel încît în cursul ploilor abundente numai un număr mic de bacterii este transportat în straturile subiacente. Datorită acestor fenomene pentru aprecierea cît mai reală a numărului de microorganisme din sol este necesar să se recurgă la acțiunea diferiților agenți fizici (ultrasonare) sau chimici (substanțe tensioactive sau chelatoare).

În aceste condiții, degradarea compușilor neadsorbiți este efectuată în special de bacteriile legate de diferite suporturi solide. Gruparea lor în microcolonii aderente stimulează schimburile respiratorii și prin prezența exopolizaharidelor asigură menținerea unui pH apropiat de cel optim și protecția față de protozoare, bacteriofagi și desicație.

În cazul bacteriei *Nitrobacter*, legarea de particule de sol mărește viteza de creștere cu ~ 25% (față de celulele libere), producerea de biomasă și viteza de utilizare a nutrienților. Efectul este însă, în principal, indirect: stratul mucos extracelular format de celulele legate creează un micromediu cu concentrație scăzută de nitrit utilizabil de *Nitrobacter* (în concentrație mare, nitritul este toxic).

În general, în literatura de specialitate se consideră că în jurul bacteriilor aderate de diferite suporturi se acumulează o concentrație de nutrienți mai mare decît cea din mediu. Aceasta ar explica atît viteza mai mare de creștere, cît și multiplicarea mai rapidă. În realitate, după van Loosdrecht (1989), bacteriile care aderă de un substrat la o distanță de ~ 5 nm (fig. 50) vin în contact direct cu stratul bogat în nutrienți doar cu o porțiune infimă (~ 0,1%) din suprafața lor.

Efectul stimulator major nu este determinat de concentrația mare de nutrienți ca atare, ci de transferul mai rapid în celulă, datorită distanței mici de difuziune a acestora.

Bacteriile aderate de substraturi sînt avantajate și de funcția glicocalixului, care, acționînd ca o rășină schimbătoare de ioni, capturează și eliberează la nevoie moleculele ce pot fi utilizate în metabolism. De asemenea, microfibrilele adsorb nutrienți, în special în mediile sărace, favorizînd utilizarea lor cu randament optim. Deși sinteza lor implică consum de energie, acesta este compensat prin capacitatea lor de a crește ritmul de creștere și multiplicare.

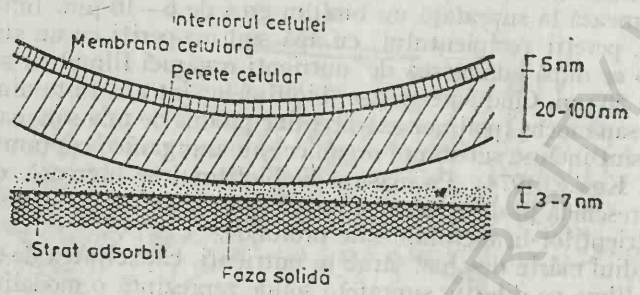



Fig. 50. — Reprezentarea schematică a zonei de interacțiune între o celulă aderată reversibil și o suprafață (după van Loosdrecht și colab., 1990).

**Fulingul** (engl. to foul = a murdări, a polua) este un fenomen complex întîlnit în formă tipică pe suprafețele submerse din mediul marin. Inițiat de un biofilm format din microorganisme heterotrofe, este urmat de depunerea de nevertebrate (moluște *(Teredo)* brahiopode, crustacee sesile *Cirripedia)* spongieri, briozoare), iar în mediul eufitic de micro- și macroalge.

Fenomenul are numeroase efecte negative (coroziunea metalelor feroase, creșterea în greutate, modificarea rezistenței hidrodinamice a navelor cu scăderea vitezei de deplasare și creșterea consumului de combustibil). El poate fi combătut prin includerea în vopsele a unor substanțe toxice biocide conținînd Hg, Pb, Cr, prin impregnarea lemnului cu catran, creozot sau alți prezervanți sau mai bine a unor substanțe chemotactic negative (acid tanic, acid benzoic, acrilamida) (Atlas și Bartha, 1987).

Fulingul este întîlnit și în medii terestre specifice, ca, de exemplu, în turnurile de răcire a apei din termocentrale, avînd ca rezultat negativ diminuarea eficienței lor, precum și în bazine de înot acoperite, în camere de baie sau frigorifice etc. În ultimul caz, microorganismele care colonizează inițial suprafețele sînt reprezentate de mucegaiuri, care se dezvoltă la un potențial redus al apei.

Dezvoltarea biofilmelor pe suprafața bioreactoarelor de laborator sau industriale modifică cinetica unui sistem în flux continuu prin formarea unei comunități microbiene sesile, cu proprietăți de creștere diferite de cele ale populațiilor din faza dispersă.

În sfîrșit, „filmele" microbiene au un rol negativ important în stațiile de tratare a apei reziduale. Ele se pot dezvolta pe substratele filtrelor biologice și pe dispozitivele de aerare. Microorganismul întîlnit cel mai frecvent este bacteria *Sphaerotilus natans*, care formează straturi groase de filamente în regiunile de ieșire (efluente)ale stațiilor de epurare (Wimpenny, 1982).

## IMPORTANȚA ECOLOGICĂ

Biofilmele se formează la orice interfață lichid/solid, lichid/lichid (ulei/apă în tancurile petroliere), lichid/aer, pe suprafețe vegetale (frunze, rădăcini, semințe care germinează), pe suprafața epiteliilor și a țesuturilor animale (căi digestive, respiratorii, genito-urinare).

Ele pot avea grosimi variabile de la cîțiva μm la zeci de mm. Romanko, Pubienes și Daukshta (1978) au demonstrat că în condiții de laborator, apa distilată formează la suprafață un biofilm gros de 6—10 μm. În același interval de timp, pereții recipientului cu apă sînt acoperiți cu un strat de 5—15 μm, în timp ce după adăugarea de nutrienți organici filmul de suprafață are grosimea de 50 μm. Cînd sînt groase, biofilmele sînt alcătuite dintr-o matrice gelatinoasă sau mucus (polimer extracelular produs de una sau mai multe specii) în care sînt incluse substanțe organice sau anorganice capturate din mediu (Bandoni și Koske, 1974). Pe măsură ce biofilmul se îngroașă, el prezintă o rezistență crescîndă la difuziunea substanțelor dizolvate și, adesea, determină absența nutrienților în regiunile sale profunde.

În mediul marin deschis, sărac în nutrienți, capacitatea de a adera și de a forma biofilme pe diferite suprafețe solide reprezintă o modalitate de acces mai avantajos la nutrienți (Geesey și White, 1990). De altfel, s-a demonstrat experimental că la concentrații foarte mici de nutrienți (glucoză $< 25\ mg/l^{-1}$), *E. coli* crește numai pe bile (perle) de sticlă. De asemenea, s-a demonstrat că în medii naturale simulate, microorganismele imobilizate desfășoară activități adesea mai diverse, mai eficiente și economic mai semnificative decît echivalenții lor planctonici.

Biofilmele au un rol important în apariția biofulingului la vapoare, deoarece ele asigură faza inițială de colonizare, la care se adaugă ulterior diferite specii animale și concrețiuni.

**Neustonul** reprezintă un caz particular de asociere a microorganismelor la suprafața apelor stagnante, respectiv la interfața aer/lichid, cînd condițiile climatice (în special, temperatura) sînt favorabile.

Cînd este alcătuit exclusiv din bacterii, neustonul are grosimea de 1 μm — > 1 μm. Cînd este mai gros sau mai vechi, are o structură mai complexă și conține, pe lîngă bacterii și alge legate de o pînză polizaharidică, pulberi și resturi vegetale (fig. 51).

Neustonul formează la suprafața apelor stagnante o peliculă fină, ca un voal, vizibilă prin difuzia luminii reflectate de oglinda apei. Cînd este foarte subțire, această peliculă este invizibilă direct. Existența sa poate fi decelată grație particulelor plutitoare care aderă de ea și pot fi antrenate de vînt (Thiery, Baudoin și Gerome, 1968).

Prezența neustonului influențează schimburile dintre apă și atmosferă (difuzia gazelor $CO_2$ și $O_2$ din aer), evaporarea apei modifică gradul de pătrundere a luminii solare și poate reprezenta un obstacol pentru organismele mici care intră sau ies din apă.

### Legarea microorganismelor de țesuturile plantelor și ale animalelor

Legarea de anumite organe ale plantelor este o etapă esențială pentru colonizarea lor de către anumite microorganisme.

Astfel, simbioza dintre *Rhizobium* și plantele leguminoase este condiționată de interacțiunea dintre lectinele produse la extremitatea perilor ra-

diculari și exopolizaharidele bacteriene, urmată de producerea de microfibrile de celuloză, care asigură legarea fermă. În afară de rizosferă, biofilmele se formează constant pe suprafața frunzelor (fitoplan) și a semințelor umezite (spermosferă).

Existența unor interrelații selective este demonstrată de faptul că frunzele verzi sănătoase, ca și situsurile de stagnare, cum sînt anticamerele stomatelor, sînt colonizate de microorganisme saprofite (bacterii și levuri),

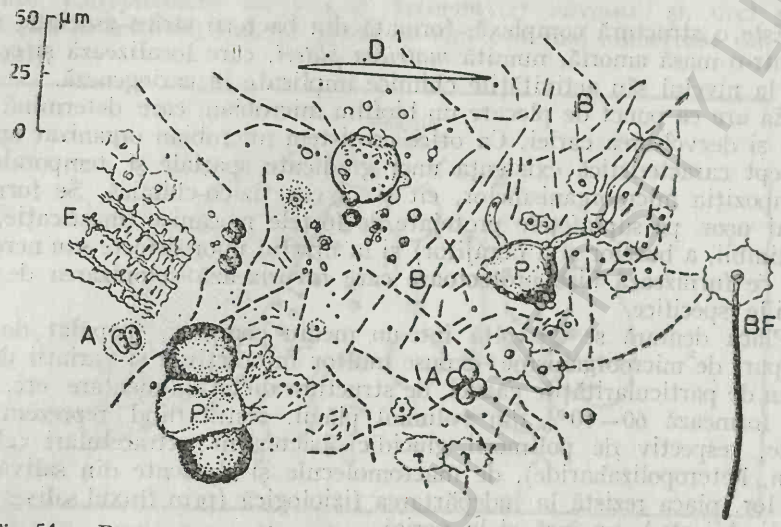



Fig. 51. — Reprezentarea schematică a unui voal de neuston (după microscopie fotonică). **A.** Alge. **B.** Bacterii în lanțuri imerse sau legate de suprafață printr-o bază flotantă (BF), **D.** Diatomee, **E.** Grăuncioare de polen. **F.** Fragmente de țesuturi vegetale, toate reunite de o substanță polizaharidică ce formează fondul voalului (după Thiéry, Baudoin și Gérome, 1968).

întîlnite mai rar în alte habitate (Last și Waren, 1972). Este probabil că aceste microorganisme care nu afectează, cel puțin aparent, sănătatea plantelor-gazdă îi pot furniza nutrienții disponibili (aminoacizi, glucide, unele substanțe de tip auxinic sau antibacterian) (Newman, 1974). Importanța legării de plantele-gazdă este ilustrată și de cazul bacteriei fitopatogene *Erwinia amylovora*, la care capacitatea de a produce boala (putregaiul umed al cartofului) este corelată cu cea de producere a polizaharidelor extracelulare.

Multe bacterii comensale, ca și unii patogeni se pot atașa și forma „filme" microbiene sau colonii, în localizări specifice pe suprafețele internă sau externă ale țesuturilor animale. Fenomenele de adeziune au un rol fundamental în legarea microorganismelor în profunzimea criptelor din căile alimentare, în localizări specifice ale căilor respiratorii sau genito-urinare, ca și în foliculii părului, în piele etc. În cazul organismelor animale, legarea bacteriilor de epiteliile căilor digestive pare să fie favorizată de stratul de mucus utilizat, probabil, și ca sursă de carbon și energie.

Legarea microorganismelor este condiționată, deci, nu numai de proprietățile bacteriilor, ci și de cele ale suprafețelor utilizate ca suport.

## PLACA DENTARĂ CA ECOSISTEM

**„Aderența este, *per se*, un determinant ecologic major, care influențează colonizarea bacteriană a țesuturilor gazdei".**

G. NIKIFORUK

Este o structură complexă, formată din bacterii strîns asociate, inclavate într-o masă amorfă, numită *matricea plăcii*, care localizează și concentrează la nivelul său activitățile chimice implicate în cariogeneză.

Ea are ca punct de plecare un biofilm microbian, care determină localizarea și dezvoltarea cariei. Ca orice ecosistem microbian organizat spațial, are drept caracteristică existența unor gradiente spațiale și temporale atît în compoziția microorganismelor, cît și în cea fizico-chimică. Se formează cel mai ușor pe suprafețele protejate de forțele mecanice (masticație, mișcarea limbii, a buzelor și a obrajilor) și la nivelul unor defecte sau neregularități, ce furnizează nișe protectoare care favorizează colonizarea de către bacteriile specifice.

Placa dentară se dezvoltă într-un mediu complex, populat de diferite tipuri de microorganisme, expuse multor interacțiuni și variații diurne, care țin de particularitățile gazdei, de structura dietei alimentare etc. Bacteriile formează 60—70% din volumul plăcii, restul fiind reprezentat de matrice, respectiv de polimerii glucidici bacterieni extracelulari (glucan, fructan, heteropolizaharide), de macromolecule și elemente din salivă. Datorită lor, placa rezistă la îndepărtarea fiziologică (prin fluxul salivei, mișcările limbii etc.), nu însă și la periaj.

Placa dentară conține $\sim 10^8$ bacterii/mg umed, ceea ce corespunde la o cantitate de $\sim 10^9$ bacterii acumulate zilnic pe un dinte neperiat (în salivă se găsesc $\sim 10^8$ bacterii/ml), derivate de pe suprafața țesuturilor orale.

În localizarea lor există un grad important de selectivitate, în sensul că speciile prezente pe suprafața dintelui sînt diferite de cele din mucoasa bucală, din plăcile subgingivale, din salivă etc. Cauza majoră a acestor deosebiri este reprezentată de capacitatea de legare selectivă a bacteriilor de anumite suprafețe. În general, microorganismele din cavitatea bucală se divid de cîteva ori pe zi. Evident, persistă cele atașate de diferite substraturi, cele libere fiind ingerate cu fluxul salivar. Viteza de diluție a salivei este atît de mare încît în lipsa aderenței de diferite substraturi microorganismele ar fi îndepărtate din gură (Ellwood și colab., 1982).

**Formarea plăcii.** Legarea bacteriilor nu se face de smaltul pur, curat, ci de un film organic, *pelicula salivară*, formată prin depunerea mucinei din salivă pe suprafața dintelui. Este probabil că acizii organici și unele enzime bacteriene ar contribui la precipitarea mucinei, favorizînd legarea ei de dinte (fig. 52).

În etapa următoare se produc două tipuri de interacțiuni ale bacteriilor specifice:

1) legarea lor selectivă de pelicula salivară și

2) multiplicarea bacteriilor aderente și, odată cu aceasta, posibilitatea unor interacțiuni specifice adezive și coezive, pe de o parte, între bacterii și constituenții matricei plăcii și, pe de alta, interbacteriene.

Marea specificitate a proceselor de adeziune explică, în mare măsură, diferențele în compoziția bacteriană a plăcilor dentare, comparativ cu alte situsuri bucale.

**Colonizarea bacteriană a peliculei salivare.** Prima etapă este reprezentată de adsorbția selectivă bacteriilor din salivă pe suprafața peliculei salivare sub formă de celule izolate sau de mici grupuri. Procesul este foarte selectiv, probă și faptul că microorganismele care aderă cu cea mai mare activitate *(Streptococcus sanguis* și *Actinomyces viscosus)* și, deci, cu un rol esențial în inițierea genezei plăcii nu sînt cele mai numeroase din salivă ($\sim 10^3$ ml).

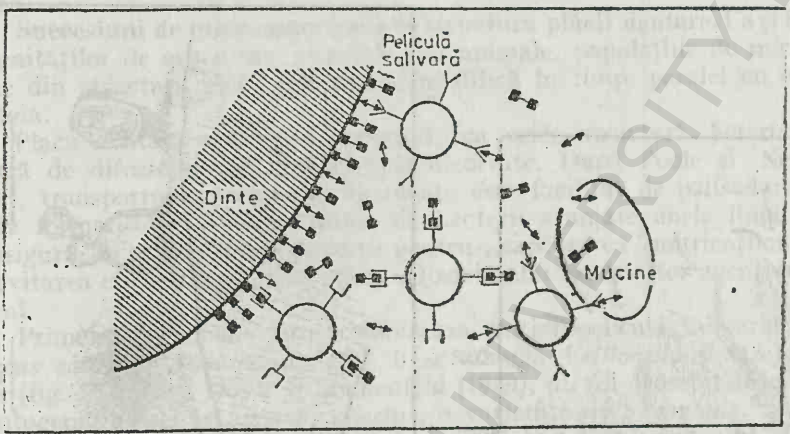



Fig. 52. — Interacțiunea bacteriilor cu pelicula de macromolecule salivare (proteine bogate în prolină) ce acoperă smaltul mineral. Celulele bacteriene au pe suprafață adezine de tip lectină, care se leagă de anumite tipuri de molecule din peliculă. Mucinele și alte glicoproteine din salivă pot, de asemenea, interacționa cu adezinele, blocînd legarea bacteriilor de dinte (după Gibbons și van Moute, 1980).

Bacteriile legate de peliculă încep să se multiplice, la început dispuse aleatoriu, formînd microcolonii și apoi un strat bacterian extins, de care aderă noi bacterii din mediu.

Inițial, placa conține celule cocoide „împachetate" dens, aproape de interfața cu pelicula, și o grupare mai laxă de forme cocoide și filamentoase la interfața salivară. Creșterea și multiplicarea sînt mai rapide la periferia plăcii, în timp ce în profunzimea ei, cu timpul, apar semne de creștere dezechilibrată (celule cu pereți îngroșați, cu depozite granulare de substanțe de rezervă, polizaharide etc.).

Microelectronografia în scanning evidențiază aranjamente ce sugerează o anumită specificitate de coeziune la nivelul contactelor interbacteriene. Astfel, la interfața salivară a plăcilor supragingivale apar grupări cu morfologie asemănătoare unor știuleți de porumb („Corn-cob groups"), rezultate din acoperirea regulată a unui filament central *(Bactrionema matruchotii)* cu bacterii în formă de coci *(Streptoccocus sanguis);* (Skobe, 1985) (fig. 53).

În plăcile subgingivale apar aspecte caracteristice asemănate cu aranjarea perilor unei perii („bristle-brushes"), formate din bastonașe și filamente, radiind de la o celulă lungă, filamentoasă.

**Mecanismele de legare a bacteriilor** în placa dentară sînt supuse acelorași reguli generale ale adeziunii cu unele elemente particulate. Diferitele macromolecule salivare favorizează apariția de agregate bacteriene, dintre care cele mai mici aderă de pelicula salivară. Materialul polimeric se leagă de peliculă prin legături de H, ionice și hidrofobe, în prezența $Ca^{2+}$. Adsorbția proteinelor salivare și a altor substanțe pe hidroxiapatita dentară se realizează pe calea atracțiilor electrostatice ce implică participarea unor grupări fosfat de pe suprafața minerală. Un rol semnificativ revine acizilor teichoici, care contribuie la sarcina electronegativă a bacteriilor, fiind capabili să formeze punți cu $Ca^{2+}$ între smalț și peliculă.

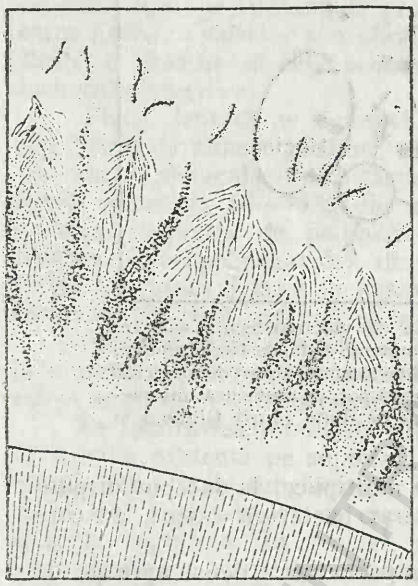



Fig. 53. — Reprezentarea diagramatică a particularităților morfologice ale plăcii supragingivale (după Nikiforuk, 1985). PS = peliculă salivară la interfața placă/dinte; MC = microcolonii în stratul microbian condensat; BF = bacterii filamentoase dispuse în palisadă; CSP = colonii bacteriene în formă de știulete de porumb.

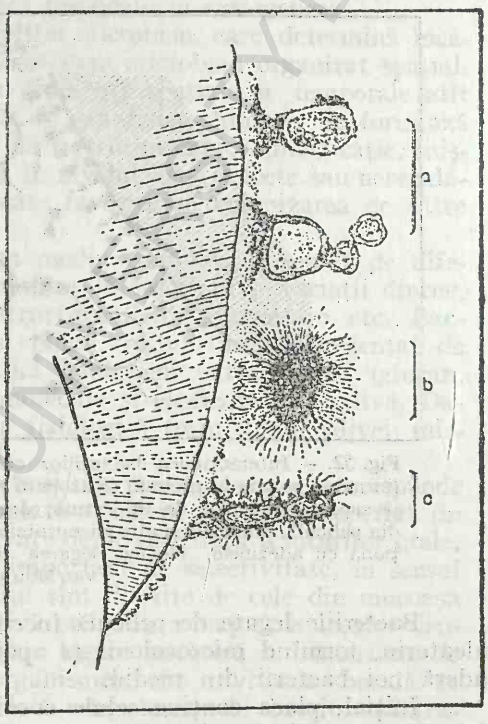



Fig. 54. — Reprezentare diagramatică a aderenței bacteriilor de pelicula salivară, indicînd asocierea de polimer prin secreția unei substanțe polizaharidice (a), prin fimbrii sau pili (b) sau prin fibrile fine polizaharidice (c) (după Nikiforuk, 1985).

În legarea specifică, ireversibilă, un rol esențial revinea dezinelor de pe suprafața bacteriilor, care reprezintă un adevărat cod chimic preformat, menit să permită recunoașterea și legarea de anumite macromolecule cu rol de receptori specifici de pe dinte și peliculă (Nikiforuk, 1985). Structura acestor receptori este complet necunoscută. Un rol important revine fimbriilor frecvent întîlnite (fig. 54).

După legare, bacteriile se multiplică, se leagă între ele, creînd astfel condiții pentru aderarea altor bacterii și componenți salivari și pentru o

serie de interacțiuni complexe. Un rol esențial în aderarea bacteriilor îl au glucanii și fructanii sintetizați de *Streptococcus mutans* de la zaharoză, care se acumulează în mase mari. Pe suprafața *S. mutans* se găsesc mai multe tipuri de liganzi pentru glucan, ca, de exemplu, glucoziltransferaze (implicate în sinteza glucanului) și proteine de legare (lectine), lipsite de activitate enzimatică. Suma interacțiunii acestor liganzi cu moleculele de glucan stimulează acumularea *S. mutans* pe suprafața dintelui.

Mutantele incapabile să sintetizeze $\alpha(1-3)$-glucan (foarte insolubil), esențial pentru cariogeneză, sînt caracterizate prin diminuarea severă a capacității de adeziune *in vivo* și *in vitro*, și implicit a virulenței în cariogeneză.

**Succesiuni de microorganisme în structura plăcii dentare.** Ca și în cazul comunităților de organisme vegetale sau animale, populațiile de microorganisme din structura plăcii dentare se modifică în timp, paralel cu evoluția acesteia.

Placa dentară constituită crecază, ca orice structură heterogenă, o barieră de difuzie pentru substanțele dizolvate. După Poole și Newmann (1971), transportul substanțelor dizolvate este facilitat de palisadarea, respectiv formarea de coloane adînci de bacterii aranjate unele lîngă altele. Ea asigură, în același timp, condiții pentru „capturarea" nutrienților și pentru evitarea eficientă a anticorpilor, a lizozimului sau a altor agenți antibacterieni.

Primelor organisme care colonizează inițial pelicula salivară *(Streptococcus sanguis, Actinomyces* sp.), li se adaugă *Veillonella* și *Streptococcus mitis* (fig. 55). După Doyle și Sonnenfeld (1989), un rol deosebit de important în patogenia cariei ar avea *S. cricetus*, o varietate de *S. mutans*.

Dacă placa este neperturbată (în sensul lezării sau îndepărtării mecanice), pe măsură ce condițiile metabolice și de mediu la nivelul său se modifică, frecvența cocilor diminuă progresiv, pentru a fi înlocuiți cu bacili și bacterii filamentoase, care cresc proporțional cu îngroșarea plăcii, pentru a deveni predominante după 7—14 zile. Ca o consecință a îngroșării și a structurii dense, mediul plăcii devine progresiv anaerob: potențialul redox ($E_h$) inițial se modifică de la +200 mV (valoarea normală în țesuturile cu metabolism aerob și în salivă) la —100 mV și chiar la —300 mV în placa veche de cîteva zile, stimulînd dezvoltarea bacteriilor anaerobe. Multiplicarea bacteriană *in situ* crecază noi suprafețe pentru colonizarea cu alte microorganisme. Spre exemplu, *Bacteroides gingivalis* se leagă avid de bacilii și cocii Gram-pozitivi și de *Actinomyces naeslundii*.

Interacțiunile foarte specifice interbacteriene explică atît succesiunea diferitelor tipuri de bacterii, care se acumulează în plăci, cît și aderarea unor organisme care, *per se*, sînt incapabile sau au doar o slabă capacitate de legare de pelicula salivară.

Analizînd frecvența de izolare a diferitelor specii la nivelul plăcii „stabilite", Silverston și colab. (1981) furnizează următoarele date: *Streptococcus* sp. 100%; bacili Gram-pozitivi 100%; *Actinomyces* sp. 100%; *Neisseria* 99%; bacili Gram-negativi 98%; *Veillonella* 94%; *Fusobacterium* sp. 55%. Între acestea, *Streptococcus mutans* este considerat ca microorganismul specific cu rol major în cariogeneză.

În concluzie, se poate spune că particularitatea dominantă a microorganismelor plăcii dentare este heterogenitatea, corelată cu o succesiune caracteristică, paralelă cu gradul de dezvoltare și cu vechimea acesteia.

Interacțiunile au un grad semnificativ de selectivitate, care face ca fiecare micromediu din cavitatea bucală și din regiuni diferite ale dinților să fie colonizate de populații proprii, unice, de microorganisme.

Particularitățile metabolice ale plăcii dentare la un situs specific sînt determinate, în esență, de compoziția bacteriană particulară a plăcii.

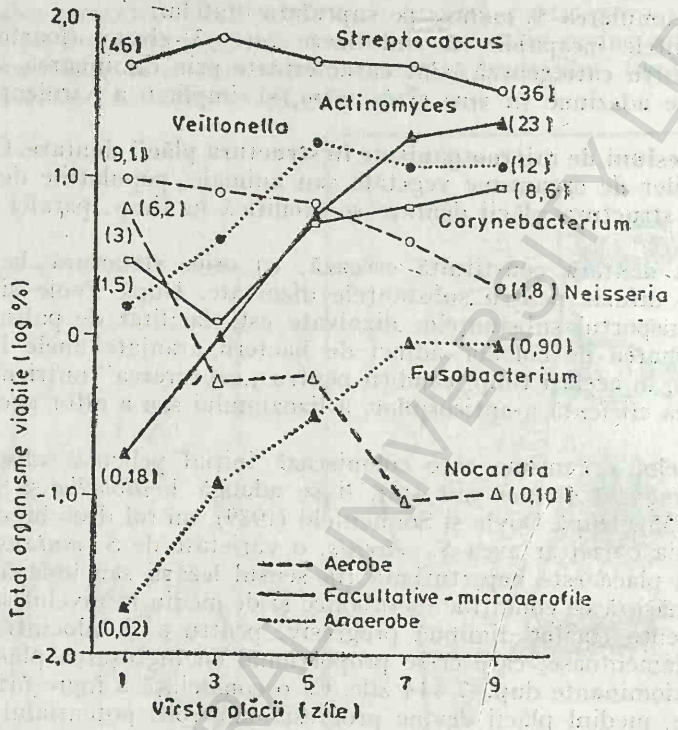



Fig. 55. — Reprezentarea grafică a modificărilor în proporția relativă a diferitelor microorganisme asociate cu îngroșarea și maturarea plăcii dentare (din Nikiforuk, 1985).

Heterogenității și complexității chimice și biologice îi corespund un spectru larg de reacții metabolice degradative, care, în special, prin metaboismul glicolitic al glucidelor ușor fermentabile din alimentație, convertesc substanțele organice la metaboliți (în special acizii formic, acetic, propionic, butiric și, mai ales, lactic) cu rol fundamental în cariogeneză.

Persoanele care consumă cantități mari de zahăr rafinat au o frecvență mai mare a cariilor deoarece zaharoza este direct metabolizată de glucozil transferaze pentru a forma fructoză:α-1,6 glucani.

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

# INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE MEDIU MICROORGANISMELE EXTREMOFILE

**„Este, probabil, că lecția cea mai importantă furnizată de Archaebacteria este, totuși, una de ordin general. Ele demonstrează cît de viguroasă este viața: din adîncurile reci ale oceanelor pînă la fierbințeala cîmpurilor solfatare—mediile cele mai apropiate de infern pe Terra — viața este pretutindeni".**

R. Pool

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE MEDIU. MICROORGANISMELE EXTREMOFILE

Prezența și activitatea microorganismelor în natură sînt condiționate de o serie de factori fizici și chimici.

În condiții favorabile, reacțiile metabolice implicate în procesele de creștere și de multiplicare se desfășoară normal, în timp ce în cazul depășirii anumitor limite de toleranță apar disfuncții de diferite grade, mergînd de la oprirea multiplicării pînă la trecerea în stare de viață latentă sau la modificări profunde ale echilibrului protoplasmatic prin denaturări incompatibile cu viața.

Activitatea biologică normală atinge nivelul său maxim atunci cînd condițiile de mediu sînt optime în raport cu necesitățile speciei. În general mai rezistente la condiții nefavorabile decît formele de viață superior organizate, microorganismele compensează printr-o mare capacitate de adaptare faptul că în natură condițiile optime se întîlnesc destul de rar.

Influența factorilor fizici și chimici este variabilă în funcție de intensitatea și durata acțiunii lor.

Cunoașterea acțiunii condițiilor de mediu permite înțelegerea distribuției microorganismelor în natură și stabilirea metodelor de combatere și distrugere a microorganismelor nedorite sau patogene.

Ținînd seama, în special, de mecanismul de acțiune al factorilor de mediu la nivel celular, separarea lor în agenți fizici și chimici, utilă pe considerente de ordin didactic, este cel mai adesea artificială.

## TEMPERATURA

Creșterea și multiplicarea microorganismelor este rezultatul unei serii de reacții metabolice coordonate a căror desfășurare normală este asigurată de o temperatură adecvată. Numeroase date experimentale demonstrează rolul fundamental al temperaturii în producerea de biomasă sau în evoluția diferitelor procese metabolice microbiene.

În general, viteza reacțiilor chimice crește pe măsură ce se ridică temperatura mediului în care au loc. Sub acest raport, reacțiile biologice nu fac excepție; în anumite limite, viteza celor mai multe reacții enzimatice aproximativ se dublează pentru o creștere de temperatură de 10°C. Relația matematică dintre viteza de reacție și temperatură este descrisă prin legea lui Arrhenius, după formula:

$$\log_{10} v = \frac{-\Delta H}{2{,}303\,RT} + C,$$

în care: v = viteza de reacție, — ΔH = energia de activare a reacției; T = = temperatura absolută în grade Kelvin. iar R și C = constante.

Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor este corelat cu acțiunea acesteia asupra reacțiilor lor enzimatice. Ca urmare, viteza celor două procese crește progresiv pe măsură ce temperatura se ridică, pînă atinge un nivel optim. Peste această limită, viteza lor scade, pînă cînd enzima este denaturată de temperatura ridicată.

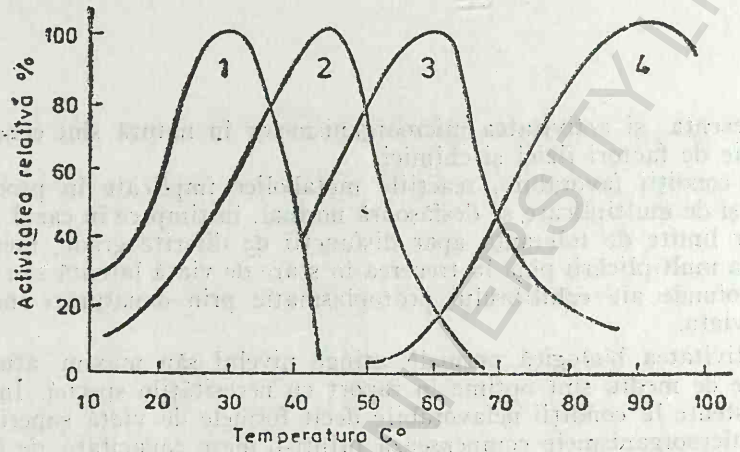



Fig. 56. — Efectul temperaturii asupra mai multor enzime. 1. Dehidrogenaza formică, provenită de la o bacterie (temperatura optimă de 25°C) și 2. de la *Escherichia coli* (temperatura optimă 35°C). 3. Amilaza de la *Thermoactinomyces vulgaris* (temperatura optimă 55°C). 4. Aldolaza de la *Thermus aquaticus* (temperatura optimă 70°C) (după Brock, 1974).

Figura 56 evidențiază faptul că temperatura optimă de activitate a unor enzime este corelată cu temperatura optimă pentru creșterea microorganismului respectiv. După cum remarcă Brock (1974), bacteriile criofile au enzime care funcționează cel mai bine la temperaturi joase, dar sînt denaturate chiar la temperaturi moderate, în timp ce bacteriile termofile conțin enzime active numai la temperaturi ridicate.

## TEMPERATURA DE DEZVOLTARE

Spre deosebire de temperaturile extreme, care sînt nocive, temperaturile moderate permit desfășurarea normală a proceselor metabolice și, prin acestea, creșterea și multiplicarea microorganismelor. Ansamblul acestor valori termice reprezintă *zona temperaturilor de dezvoltare*. În această zonă există temperaturi minime, optime și maxime de dezvoltare pentru o specie dată. Valorile acestora pot varia în funcție de compoziția chimică și de starea fizică a mediului. Diferența dintre temperatura minimă și cea maximă este mare la *microorganismele euriterme* (6°C și respectiv 50°C) sau doar foarte mică (35°C și respectiv 40°C) la cele *stenoterme*.

### Temperatura minimă de dezvoltare

Reprezintă cea mai scăzută valoare termică la care microorganismele se mai multiplică încă în mod evident. La această temperatură, metabolismul este scăzut, iar ritmul de creștere și de diviziune celulară este mult încetinit. Intervalul dintre două diviziuni poate ajunge la 6—7 ore, în cazul unor bacterii care în condiții optime se divid la fiecare 20 de minute.

Limita inferioară a temperaturilor minime este determinată teoretic de temperatura de îngheț a apei. Practic însă, aceasta este situată sub 0°C (—5°C) datorită faptului că punctul de congelare a constituenților celulari este mult mai scăzut decît cel al apei pure, în prezența moleculelor organice și minerale pe care le conțin în soluție.

În condiții particulare, care măresc zona de stabilitate fizică a apei celulare (conținut bogat în diferite substanțe, presiune osmotică ridicată etc.), temperatura minimă tolerată de microorganisme poate să scadă pînă la —18°C. Aceasta explică de ce anumite specii de microorganisme se multiplică în apa mării (t° de îngheț — 1,9°C) și chiar la —5 °C. Unele bacterii (*Pseudomonas* sp.), precum și unii fungi se pot multiplica în soluții concentrate de zahăr (sirop de fructe) chiar la —18°C. La asemenea temperaturi foarte scăzute, toate reacțiile metabolice se desfășoară atît de lent încît durata unei generații poate atinge valori de săptămîni sau chiar luni.

După unele date experimentale, temperatura minimă limită a microorganismelor mezofile ar fi determinată de încetarea transportului substanțelor dizolvate prin membrana celulară.

Bazele biochimice ale inactivării acestui transport sînt necunoscute. Au fost implicate trei mecanisme, care ar putea acționa separat sau sinergic: 1) modificarea conformațională a proteinelor; 2) modificări în arhitectura membranei celulare; 3) limitarea producerii și utilizării ATP.

Temperatura minimă poate induce anumite modificări fenotipice ale bacteriilor. Astfel, *Serratia marcescens* produce mai mult pigment roșu — prodigiozină — la 20 — 25°C decît la 37°C, temperatură la care creșterea este mult mai intensă. De asemenea, producerea flagelilor ar fi favorizată în cazul unor microorganisme de temperaturile scăzute.

### Temperatura optimă de dezvoltare

Convențional este definită ca temperatura la care dezvoltarea populației de microorganisme, aparținînd unei anumite specii, se face în modul cel mai intens, adică are ca rezultat formarea celui mai mare număr de celule într-un timp dat (fig. 57, 58).

Această valoare nu coincide cu aceea a temperaturilor optime pentru diferite alte activități fiziologice ale celulei. De aceea, numărul cel mai mare de celule nu se acumulează cînd diviziunea se face foarte rapid, ci, dimpotrivă, în condițiile unei diviziuni mai lente.

Acest fenomen ar putea fi explicat prin diferențele de temperatură optimă pentru evoluția numeroaselor activități enzimatice implicate în procesul de multiplicare, considerat în ansamblul său, precum și prin creșterea ritmului de producere și de acumulare a produșilor toxici de catabolism.

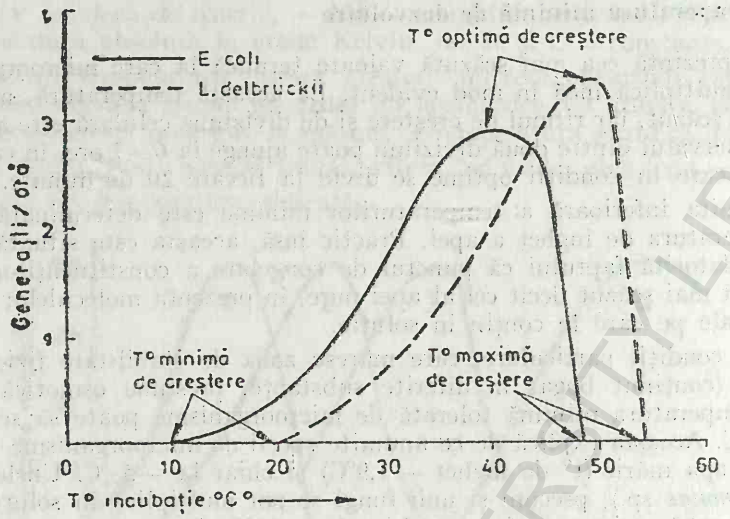



Fig. 57. — Efectul temperaturii asupra vitezei de multiplicare la *Escherichia coli* și *Lactobacillus delbrückii*.

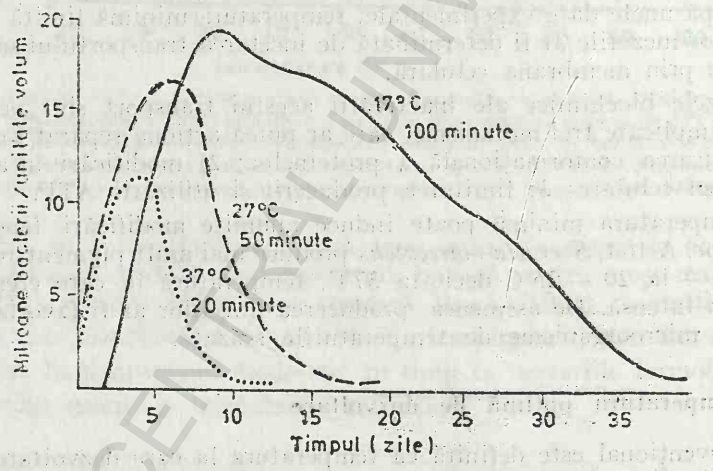



Fig. 58. — Efectul temperaturii asupra formării de biomasă *la Staphylococcus aureus*, în raport cu timpul. Cifrele indică durata generației, în minute, pentru fiecare temperatură (după Graham și Smith, 1980).

În mod similar, viteza de fermentație sau de acumulare a unui produs de metabolism este maximă la diferite temperaturi care nu coincid obligatoriu cu temperatura optimă pentru diviziunea celulară (tabelul nr. 9).

Prin urmare, nu se poate vorbi în mod absolut despre o temperatură optimă, în general, pentru o anumită specie, ci de o temperatură optimă pentru fiecare din activitățile ei biologice.

De menționat că temperatura optimă nu reprezintă media aritmetică dintre minimă și maximă, ci se apropie mai mult de valorile temperaturii maxime.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

*Tabelul nr. 9*

**Temperaturile optime pentru unele activități fiziologice ale bacteriilor Streptococcus lactis și S. thermophilus**

| Natura procesului | Temperatura optimă (°C) | |
|---|---|---|
| | *S. lactis* | *S. thermophilus* |
| Viteza maximă de multiplicare | 34 | 37 |
| Numărul maxim de celule/ml | 25—30 | 37 |
| Viteza maximă de fermentație | 40 | 47 |
| Producerea maximă de acid | 30 | 37 |

## Temperatura maximă de dezvoltare

Reprezintă valoarea cea mai ridicată la care activitatea biologică a unui anumit microorganism este încă posibilă, iar multiplicarea se mai poate face încă în mod evident.

Această valoare, limitată de termolabilitatea proteinelor și a acizilor nucleici, este, de obicei, cu 10—15°C mai mare decît temperatura optimă a microorganismului respectiv.

În funcție de temperaturile lor de dezvoltare, microorganismele pot fi grupate în trei categorii: *criofile* (psichrofile), *mezofile* și *termofile* (tabelul nr. 10).

*Tabelul nr. 10*

**Temperaturile de dezvoltare ale unor microorganisme și raportul cu habitatul lor natural**

| Specia | Habitatul | Temperatura de dezvoltare °C | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Minimă | Optimă | Maximă |
| *Bacillus stearothermophilus* | Sol, produse alimentare contaminate | 30 | 50—65 | 70 |
| *Bacillus subtilis* | Sol, substanțe vegetale în descompunere | 8 | 28—40 | 50—55 |
| *Cadlosporium herbarum* | Sol | 0 | 28—40 | 37 |
| *Clostridium thermocellum* | Sol, nămol marin, intestinul animalelor | 50 | 60 | 68 |
| *Escherichia coli* | Intestinul vertebratelor | 8—10 | 37 | 47 |
| *Mycobacterium tuberculosis* | Organismul uman | 30 | 37 | 40 |
| *Neisseria meningitidis* | Nazofaringe la om | 25 | 36—37 | 40 |
| *Pseudomonas gelatica* | Mări, oceane | 0 | 20—25 | 30—32 |
| *Pseudomonas pisi* | Sol de grădină | 7 | 28 | 37 |
| *Saccharomyces ellipsoideus* | Sol, suprafața plantelor | 0 | 30—35 | 40 |

Preferințele termice și particularitățile de termotoleranță sînt rezultatul adaptării microorganismelor la mediu, realizat prin mutație, transfer de informație genetică și selecție naturală, sub acțiunea unor factori caracteristici esențiali ai habitatului lor natural (tabelul nr. 11).

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

*Tabelul nr. 11*

**Caracteristicile temperaturilor de dezvoltare ale microorganismelor**

| Grupul | | Temperatura (°C) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Minimă | Optimă | Maximă |
| 1. Criofile | Obligate | −5—+5 | 15— 18 | 30— 35 |
| | Facultative | −5—+5 | 25— 30 | 30— 35 |
| 2. Mezofile | | 10—15 | 30— 40 | 35— 47 |
| 3. Termofile | | 40—45 | 55— 75 | 60— 80 |
| 4. Hipertermofile | | 50—82 | 80—105 | 85—110 |

*Microorganismele mezofile* au temperatura optimă de dezvoltare de 25—40°C. Nu se dezvoltă sub 10°C, datorită inactivării unor procese metabolice esențiale sensibile la frig. La *Escherichia coli*, acestea sînt reprezentate de blocarea sintezei proteinelor și de inhibarea prin feedback a activității enzimelor. Inhibitorul este, probabil, un metabolit celular normal, care se leagă puternic de anumite enzime la temperaturi scăzute. Dovada o constituie faptul că încălzirea celulelor bacteriene este urmată de disocierea lui și reluarea proceselor normale.

Microorganismele patogene pentru om și animalele homeoterme sînt mezofile.

## MICROORGANISMELE TERMOFILE

Acestea sînt prezente în natură la suprafața solurilor intens însorite, care pot ajunge la temperaturi cuprinse între 50 și 70°C, în produsele însilozate care fermentează (60—65°C), în apa izvoarelor termale, în asociere cu fenomenele vulcanice.

Apa gheizerului din Yellowstone National Park, avînd în regiunea de emisie 92—100°C, este răcită progresiv spre periferie, permițînd dezvoltarea diferitelor categorii de microorganisme termofile. Cele mai caracteristice sînt unele alge intens colorate în oranj, datorită cantității mari de pigmenți carotenoizi.

**Clasificarea microorganismelor termofile.** În funcție de condițiile lor de dezvoltare au fost descrise mai multe categorii de microorganisme ce se pot dezvolta la temperaturi ridicate:

1) *Microorganismele termotolerante* cresc atît la temperatura camerei, cît și la 45—50°C. Unele sînt *termodure* (au temperatura optimă de 25—37°C), dar supraviețuiesc și la 70°C.

2) *Microorganismele termofile obligate* („adevărate", stricte sau ortotermofile) se dezvoltă optim la 65—70°C, nu însă și la 40—42°C. Sînt, deci, stenoterme.

3) *Microorganismele termofile facultative* se dezvoltă la temperatura maximă de 50—65°C, dar pot să crească și la temperatura camerei. Sînt, deci, euriterme, deoarece se dezvoltă în limite mari de temperatură (30—50°C).

4) *Microorganismele termofile extreme*, numite de Heinen și Heinen (1972), *caldoactive*, cresc la temperatura minimă de 40°C, optimă de 65°C și maximă > 70°C (de exemplu, *Bacillus caldotenax*, *B. caldolyticus*).

Clasificarea nu este lipsită de ambiguități și trebuie folosită cu precauție, deoarece, experimental s-a demonstrat că, în unele cazuri, temperatura de creștere poate fi modificată prin adaptarea culturii. Jung și colab. (1974) au demonstrat că celulele cultivate la 37°C nu se pot dezvolta la 55°C decît după o perioadă de adaptare la temperaturi intermediare (46°C). Este, de asemenea, demonstrat că unele termofile își modifică setul de enzime ca răspuns la temperatura de incubare sau producînd forme diferite ale aceleiași enzime la temperaturi diferite.

Bacteriile termofile pot fi aerobe, anaerobe sau facultativ anaerobe, foto- sau chemosintetizante, autotrofe sau heterotrofe. Cel mai mult studiate sînt cele din genurile: *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Flexibacteria*, *Oscillatoria*, *Mastigocladus* etc.

**Bazele moleculare ale termofiliei** sînt încă necunoscute. Au fost propuse mai multe mecanisme:

1) Allen (1983), ca și Koffler (1957) au emis ipoteza că termofilele ar crește la temperaturi ridicate, utilizînd enzime termolabile, datorită capacității lor de a le resintetiza constant și rapid cu o viteză suficientă pentru a menține concentrația necesară în celulă, deși sînt mereu inactivate. Ipoteza presupune o creștere a sintezei de două — trei ori pentru fiecare 10°C, ceea ce, teoretic, ar fi posibil datorită dimensiunilor mici ale celulei și suprafeței mari care ar favoriza transportul rapid al nutrienților în celulă și al reziduurilor spre exterior.

2) Ipoteza termostabilității proteinelor celulare se bazează pe unele observații: α-amilaza produsă de o bacterie facultativ termofilă la 55°C este mai termostabilă decît cea produsă de aceeași bacterie la 37°C. Singleton și Amelunxen (1973) consideră că microorganismele termofile, în general, sintetizează componenți macromoleculari greu denaturabili termic, deoarece au o termostabilitate intrinsecă, independentă de factori stabilizatori adiționali.

După alți autori, enzimele termofile ar avea *in vivo* o structură mai rigidă, datorită unor legături puternice intracatenare. Rigiditatea conferă stabilitate, dar, în același timp, ar diminua capacitatea de interacțiune alosterică și afinitatea pentru substrat care necesită o anumită flexibilitate de structură. În felul acesta, este probabil că termofilele și-au sacrificat eficiența și mecanismele de reglare pentru a crește la temperaturi ridicate.

După Manning și colab. (1961), enzimele termofilelor ar putea fi active în stare depliată (deci, într-o stare în care efectul denaturant al temperaturii este foarte redus), cum este cazul α-amilazei de la *Bacillus stearothermophilus*.

3) După Chan și colab. (1972), învelișurile celulare ale bacteriilor termofile facultative cultivate la 55°C sînt mult mai rezistente decît la 37°C. Ele diferă în compoziția chimică, sensibilitatea la lizozim, morfologia la microscopul electronic etc. Un rol esențial stabilizator revine membranei citoplasmatice. Astfel, fosfataza alcalină de la *B. stearothermophilus* este mult mai stabilă în membrana celulară decît în celulele lizate. Aceasta sugerează că membrana celulară ar stabiliza enzimele „solubile" printr-o asociere laxă, printr-un aranjament arhitectural specific sau, pur și simplu, printr-o concentrație mai ridicată.

Rolul membranelor în termofilie pare să fie demonstrat și de cazul membranelor intracelulare.

Incapacitatea celulelor eucariote de a se dezvolta la temperaturi ridicate s-ar datora sistemelor membranare mult mai complicate și în special a celor care delimitează diferitele organite (nucleu, mitocondrii, cloroplaste).

De asemenea, cianobacteriile fixatoare de $N_2$, morfologic și biochimic mai complexe structural, nu cresc la temperaturi atît de ridicate ca echivalentele lor nefixatoare de $N_2$.

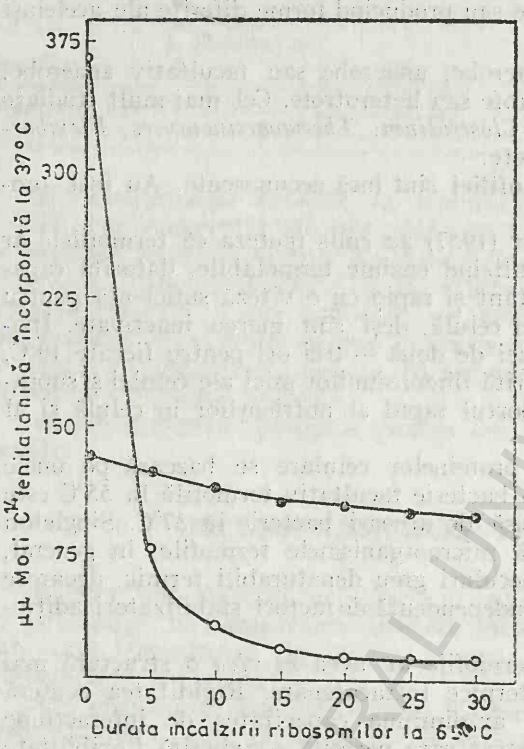



Fig. 59. — Termostabilitatea ribosomilor de la *Escherichia coli* (O) și *Bacillus stearothermophilus* (●) (după Friedman, 1968).

4) Rolul structurii speciale a lipidelor se bazează pe observația că, pe măsură ce temperatura de creștere a microorganismelor este mai ridicată, procentajul acizilor grași saturați și ramificați (cu punct de topire mai ridicat) crește, conferind o mai mare stabilitate.

5) În asigurarea termofiliei au mai fost incriminate stabilitatea ribosomilor (fig. 59), a întregii „mașinării" de sinteză a proteinelor, prezența unor polimeri neobișnuiți ai acizilor teichoici etc.

Este, probabil, că rezistența celulelor procariote la temperaturi mari ar fi consecința interacțiunii mai multor mecanisme moleculare, între care funcția și stabilitatea membranelor celulare și sinteza proteinelor ar juca un rol precumpănitor.

*Limita superioară a termofiliei* este variabilă în funcție de natura microorganismelor. Ea variază în jur de 45—50°C pentru protozoare, 56°C pentru algele eucariote, 60°C pentru microfungi, 70—73°C pentru cianobacterii și peste 99°C pentru *Archaebacteria*. Pe baza acestor date pot fi formulate următoarele concluzii:

1) microorganismele procariote se dezvoltă la temperaturi mai mari decît cele eucariote;

2) microorganismele cu structură simplă se dezvoltă la temperaturi mai mari decît cele cu arhitectură celulară complexă;

3) microorganismele nefotosintetizante cresc la temperaturi mai ridicate decît cele fototrofe.

**Ecologie.** Microorganismele termofile se găsesc în natură în izvoarele termale, pe suprafața solului puternic însorit, în turbării, precum și în efluenții centralelor hidroenergetice sau ai unor industrii, în depozitele de fîn, cereale, compost. Ele pot dezvolta, pe lîngă procese fermentative, unele activități particulare, ca, de exemplu, celulozoliză, utilizarea hidrocarburilor, reducerea sulfaților etc.

**Originea termofiliei.** Microorganismele termofile reține multe din proprietățile formelor de viață primitive. Cele din izvoarele termale ar fi relicte ale formelor primordiale de viață apărute în Precambrian. Probabil că mezofilele au apărut din termofile prin mutații și selecție, care au determinat modificări în „mașinăria" de sinteză a proteinelor și în cinetica enzimatică. Ele și-au pierdut termofilia pentru a dobîndi enzime mai flexibile și cu afinitate mai mare pentru substrat, precum și capacitatea de a crește rapid la temperaturi mai mici (Brock, 1974).

## BACTERIILE HIPERTERMOFILE

Sub această denumire, Stetter și colab. (1990) au descris un grup de bacterii care au capacitatea puțin obișnuită de a se dezvolta foarte bine la temperaturi cuprinse între 80 și 110°C. În general, nu cresc sub 60°C, iar unele chiar sub 80°C. Supraviețuiesc însă cîțiva ani la temperaturi joase.

**Biotopurile bacteriilor hipertermofile** sînt următoarele:

1) Regiunile hidrotermale submarine, anaerobe, bogate în $H_2S$, $H_2$, $S^0$ și $SO_3^{2-}$, avînd pH 5,0—8,5 și o concentrație în NaCl și $SO_4^{2-}$ caracteristică apei de mare.

2) Solfatarele continentale* bogate în sulfați, $CO_2$, CO, $CH_4$, $NH_4^+$, avînd pH 0,5—6. Sînt oxigenate în straturile superioare, în general acide, colorate ocru, din cauza depozitelor de Fe feric. În profunzime sînt anaerobe, mai puțin acide sau chiar neutre (pH 5,0 — 7,0). Uneori conțin izvoare calde, ușor alcaline (pH 7,5—9,0) și bogate în NaCl.

3) Efluenții fierbinți ai stațiilor geotermale.

**Taxonomie.** Au fost identificate, pînă în prezent, 35 de specii, dintre care numai 6 sînt eubacterii, aparținînd ordinului *Thermotogales*, respectiv a trei genuri: *Thermotoga*, *Thermosipho* și *Fervidobacterium*.

Celelalte au fost grupate în *Archaebacteria***, anterior identificării lor pe baza a două argumente:

1) absența unor microorganisme mezofile înrudite;

---

* Solfatare — emanații de gaze fierbinți, constituite în special din vapori de apă, $CO_2$ și $H_2S$, eliminate din cratere sau fisuri ale unor vulcani latenți. Sînt sursa depunerii unor cruste de sulf, în jurul regiunii din care sînt eliminate.

** *Archaebacteria*. Denumirea reflectă concepția lui Woese și Fox (1977), după care aceste microorganisme ar fi cele mai vechi bacterii cunoscute, păstrînd încă o formă de metabolism care pare bine adaptată la condițiile ce au predominat în atmosfera primitivă, în momentul apariției vieții pe pămînt (bogăția în $CO_2$, prezența $H_2$, CO și absența $O_2$, temperaturi ridicate etc.). În momentul în care compoziția atmosferei primitive s-a schimbat, arhebacteriile s-au limitat ca răspîndire la o serie de medii speciale, relativ inaccesibile altor categorii de microorganisme.

Recent, Woese (1990) consideră că a greșit dînd această încadrare sistematică acestor organisme, deoarece, exceptînd aspectul fizic asemănător cu bacteriile „adevărate", la nivel molecular sînt foarte diferite (au subunități ribosomale cu formă neobișnuită, conțin ARNr și ARNt mult modificat față de eubacterii, cresc la temperaturi apropiate de punctul de fierbere al apei, în medii hipersaline etc.). Pe aceste criterii se consideră că „Archaebacteria nu sînt mai apropiate de bacterii decît de om" (Pool, 1990). Pe baza acestor date, Woese (1990) admite că eubacteriile au apărut, în timp, ca organisme primordiale, cu aproximativ o jumătate de miliard de ani înaintea archebacteriilor și a eucariotelor. Aceste diferențe sînt atît de mari, încît pot permite încadrarea acestor forme particulare de viață ca un regn integral aparte.

El propune organizarea lumii vii în trei grupuri distincte: *Bacteriotida*, *Archaeotida* și *Eukaryotida*. În acest cadru, *Archaebacteria* rămîn, în continuare, după Pool (1990), legate de un caracter discutabil (*Archae* = vechi, primitiv), dar cel puțin nu vor mai fi numite *bacterii*.

2) datorită faptului că biotopul lor există din Archean, sugerînd că ar fi adaptate să trăiască de miliarde de ani, la temperaturi foarte ridicate.

Ele aparțin la nouă ordine : *Sulfolobales*, *Thermoproteales*, *Pyrodictiales*, *Thermococcales*, *Thermoplasmales*, *Archaeoglobales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* și *Methanopyrus*.

Bacteriile hipertermofile sînt, în general, anaerobe. Supraviețuiesc în prezența $O_2$ mai mult la temperaturi scăzute (cînd nu cresc) decît la temperaturi ridicate. Proprietatea este esențială pentru dispersarea lor în regiuni cu temperaturi joase, dar oxigenate. Cele mai multe metabolizează sulful.

Cele mai hipertermofile sînt cele din genul *Pyrodictium*, care cresc la 110°C, au ca temperatură optimă 100—105°C și ca temperaturi minime 80—82°C. Limita superioară de temperatură care permite creșterea este necunoscută, ca și mecanismul molecular al hipertermofiliei (tabelul nr. 12).

Ținînd seama de faptul că, în mod normal, moleculele biologice esențiale (proteinele și acizii nucleici) sînt inactivate la temperaturi ce depășesc 60—70°C, au fost propuse mai multe mecanisme ipotetice, care ar putea sta la baza hipertermofiliei:

1) existența unor principii termostabilizante, încă neidentificate;

2) prezența unor enzime cu o structură spațială globulară suigeneris, deși sînt alcătuite din aminoacizi normali;

3) rolul protector al unor proteine de tip histonic, care ar mări stabilitatea ADN;

4) configurația mult mai strînsă a dublei helice a ADN, care ar îngreuia separarea catenelor componente. Pace (1990), pe baza unor date experimentale, consideră că temperatura maximă de creștere a microorganismelor ar putea fi cuprinsă între 110°C și 150°C. Între aceste limite de temperatură, biomoleculele termosensibile ar putea fi încă sintetizate cu o viteză biologic posibilă.

## MICROORGANISMELE PSICHROFILE

Conceptul de microorganism psichrofil este destul de ambiguu. În plus, de-a lungul anilor au fost folosite diferite denumiri pentru a desemna această categorie de microorganisme: bacterii glaciale, rhigofile, psichrofile (Schmidt și Nielsen, 1902), psichrotolerante, psichrocarterice, termofobe, criofile, psichrotrofe etc.

Pentru Schmidt și Nielsen, microorganismele psichrofile nu numai că supraviețuiesc, dar chiar se multiplică la 0°C (produc colonii sau turbiditate vizibile cu ochiul liber).

Hucker (1952) le împarte în *psichrofile obligate*, care cresc la 0°C, nu însă și la 32°C, și *facultative*, care cresc atît la 0°C, cît și la 32°C.

Ingraham și Stokes (1959) propun o definiție care nu ține seamă de temperaturile cardinale, definind psichrofilele ca organisme care cresc bine (producînd colonii sau turbiditate vizibile cu ochiul liber) în două săptămîni.

Morita (1976) încadrează ca psichrofile, microorganismele care au ca temperatură minimă 0°C, optimă 15°C și maximă în jur de 20°C.

Innis (1975) propune trei categorii de microorganisme „iubitoare' de frig:

1) *obligate*, care cresc numai sub 10°C;

2) *facultative* (cresc la 0°C și au temperatura optimă de 10—30°C);

*Tabelul nr. 12*

**Condițiile de creștere, habitatul, morfologia și procentul de baze (G+C%) al unor bacterii hipertermofile**
(modificat după Stetter, 1990)

| Specia | Condițiile de cultivare | | | | | Habitat | ADN (G+C%) | Morfologia |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Temperatura (°C) | | | pH | Aerobe (Ae) Anaerobe (An) | Marin (M) Solfatare (S) | | |
| | minimă | optimă | maximă | | | | | |
| *Sulfolobus acidocalcarius* | 60 | 80 | 85 | 1,0–5,0 | Ae | S | 37 | Coci lobulați |
| *Acidianus infernus* | 60 | 88 | 95 | 1,5–5,0 | Ae/An | S | 31 | Coci lobulați |
| *Thermoproteus tenax* | 70 | 88 | 97 | 2,5–6,0 | An | S | 56 | Bacili cu sfere terminale |
| *Pyrobaculum islandicum* | 74 | 100 | 103 | 5,0–7,0 | An | S | 46 | Bacili cu sfere terminale |
| *Staphylothermus marinus* | 65 | 92 | 98 | 4,5–8,5 | An | M | 35 | Coci în agregate |
| *Pyrodictium occultum* | 82 | 105 | 110 | 5,0–7,0 | An | M | 62 | Discuri cu fibre |
| *Pyrodictium abyssum* | 80 | 100 | 110 | 4,7–7,5 | An | M | 60 | Discuri cu fibre |
| *Thermococcus celer* | 75 | 87 | 97 | 4,0–7,0 | An | M | 57 | Coci |
| *Pyrococcus furiosus* | 75 | 100 | 103 | 5,0–9,0 | An | M | 38 | Coci |
| *Archaeoglobus fulgidus* | 60 | 83 | 95 | 5,5–7,5 | An | M | 46 | Coci neregulați |
| *Methanothermus sociabilis* | 65 | 88 | 97 | 5,5–7,5 | An | S | 33 | Bacili în grupuri |
| *Methanococcus jannaschii* | 50 | 85 | 86 | 5,5–6,5 | An | M | 31 | Coci neregulați |
| *Thermotoga maritima* | 55 | 80 | 90 | 5,5–9,0 | An | M | 46 | Bacili în teacă |

BCU IAȘI / CENTRE CENTRAL LIBRARY

3) *psichrotolerante* (cresc la 0°C și au temperatura optimă de 18—20°C).

Confuzia este mărită de faptul că mulți cercetători încadrează ca psichrofile orice microorganisme care se dezvoltă la temperaturi scăzute. Or, așa cum s-a demonstrat frecvent, unele microorganisme se pot dezvolta în limite caracteristice pentru două grupuri termale adiacente (de exemplu, mezofil/psichrofil sau mezofil/termofil). Pentru bacteriile mezofile care cresc la 0°C, termenii cei mai potriviți sînt cei de *psichrotrof* sau *psichrotolerant*.

**Aria de răspîndire.** Microorganismele psichrofile sînt reprezentate de bacterii (coci, bacili sporulați și nesporulați) și levuri izolate din solul înghețat, zăpada și gheața din Antarctica, suprafața și intestinul peștilor marini, fecalele de pescăruș și de focă. Ele nu sînt specifice regiunilor respective deoarece au fost izolate și din izvoare, rîuri, lacuri și sol din regiuni cu climat temperat (Innis, 1975).

**Principalele specii identificate** sînt: *Achromobacter glacilis*, *Bacillus insolitus*, *B. psychrophillus*, *Cytophaga psychrophila*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio marinus* și *Candida gelidis*. Din categoria microorganismelor criofile fac parte și algele *Chlamydomonas nivalis* (care prezintă celule vegetative verzi și sporii roșii strălucitori, prezente pe suprafața zăpezilor eterne la mijlocul sau la sfîrșitul verii) și *Fragillaria sublincaris* (temperatura optimă de dezvoltare 7°C, temperatura maximă 12°C).

**Creșterea microorganismelor psichrofile** este, în general, mai lentă decît cea a celor mezofile. Timpul de generație variază după specie, de la cîteva ore la zile sau chiar la săptămîni: 28 de ore la 0°C pentru *Micrococcus cryophilus;* 80 de minute la 15°C și 226 minute la 3°C pentru *Vibrio marinus*; 390 de minute pentru *B. psychrophilus* la — 5°C.

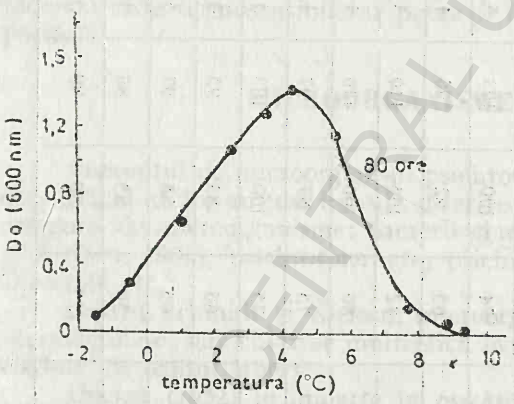



Fig. 60. — Dinamica dezvoltării unei tulpini de *Vibrio* psichrofil (AP—2—24), izolată din Antarctica, apreciată pe baza densității optice (DO). Incubarea a durat 80 de ore, în termostat cu gradient de temperatură (după Morita, 1975).

Figura 60 reprezintă curba de creștere a unei bacterii izolată din Antarctica, exprimată ca densitate optică.

În mod curent, creșterea unui microorganism este considerată ca rezultatul unei serii complicate de reacții chimice, care pot fi analizate utilizînd efectele cunoscute ale temperaturii asupra reacțiilor chimice pe baza ecuației:

$$K = (-\Delta H_a/RT) + C$$

în care: K este constanta reacției, $\Delta H_a$ — căldura de activare ($\Delta E$ energia de activare), R = constanta gazului, T = temperatura absolută, iar C = 0 constantă.

Ea permite examinarea interacțiunii dintre temperatură și creștere (în aceste condiții, K devine rata de creștere a microorganismului, iar $\Delta Ha$ este denumită temperatura caracteristică și notată cu $\mu$).

Utilizînd această ecuație, Ingraham (1958) a comparat curba de creștere a unei bacterii psichrofile cu cea a *E. coli*. A constatat că cele două

curbe (fig. 61) diferă ca formă, datorită faptului că temperatura de creștere a unei bacterii mezofile este de 1,6 ori mai mare decît cea caracteristică psichrofilelor.

**Bazele psichrofiliei** nu sînt cunoscute.

După unele ipoteze, proteinele criofilelor ar fi mult mai termolabile decît cele ale mezofilelor în sensul că structurile lor secundară și terțiară ar fi, în mod special, adaptate unei activități mai eficiente în jur de 0°C. Relativ recent, Franks (1985), utilizînd metode moderne, a arătat că secvența și topologia unor proteine izolate de la crio-, mezo- și termofile sînt foarte omologe. Adaptarea moleculară la temperaturi extreme ar necesita numai alterări marginale ale interacțiunilor intermoleculare și ale densității de „împachetare". Unele date statistice și analize structurale demonstrează că variația ionilor și a interacțiunilor hidrofobe permit flexibilității proteinelor să se adapteze în așa fel încît să-și mențină funcția catalitică integrală la temperaturi diferite.

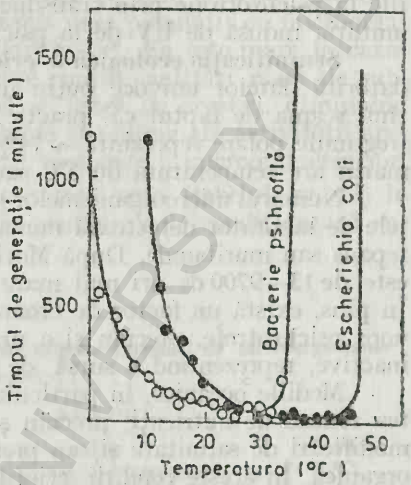



Fig. 61. — Efectul temperaturii asupra timpului de generație al unei bacterii psichrofile comparativ cu *Escherichia coli* (după Ingraham, 1958).

Moartea bacteriilor psichrofile la temperaturi ridicate s-ar datora lezării cîtorva molecule esențiale a căror sinteză încetează la temperaturi cu 1—2°C mai mari decît temperatura maximă (punctul termic mortal este de regulă cu 5—10°C mai mare decît t° maximă).

Experimental s-a demonstrat că în cazul unei bacterii criofile cu temperatura maximă de 19°C, sinteza ARN (în special ARNr) crește pînă la 18°C, scade între 18 și 19°C și este stopată la 20°C. De asemenea, ribosomii criofilelor au o mare sensibilitate la temperaturi ridicate. La *Micrococcus cryophilus*, spre exemplu, moartea este corelată cu inhibarea sintezei proteinelor la 30°C.

La temperaturi moderate (20—30°C), moartea celulelor este urmată sau, după unii cercetători, asociată cu pierderea conținutului celular, printr-un proces indus treptat. La *Vibrio fischeri (marinus)* sînt pierdute cu o viteză descrescîndă proteinele, ADN, ARN, aminoacizii și unele enzime esențiale. În alte cazuri *(V. psychroerythrus)*, moartea este determinată de un proces de liză enzimatică indus de temperatură (20°C sau peste). Sensibilitatea criofilelor la temperaturi moderate este maximă în faza de creștere logaritmică. Celulele bătrîne sînt mai rezistente atît față de liză, cît și la pierderea constituenților celulari, prin modificările în arhitectura și funcția membranelor celulare.

**Modul de apariție a criofilelor.** Bazele genetice ale psichrofiliei nu sînt cunoscute, dar se admite că structura genetică este cea care determină caracteristicile temperaturii de creștere. În general, cercetătorii sînt de acord că în cursul evoluției microorganismelor inițial au apărut termofilele, apoi mezofilele și final criofilele.

Apariția psichrofilelor ar fi rezultatul mai multor evenimente genetice, deoarece ele prezintă atît diferențe în structura membranei celulare, cît și în setul de enzime termolabile. Este probabil că acest fenomen s-a realizat prin mutații succesive ale unor organisme care au trăit de-a lungul mai multor generații într-un mediu rece. Probabil că punctul de plecare în evoluția criofilelor au fost microorganismele mezofile. În acest sens, Morita (1975) citează unele argumente experimentale ca, de exemplu, conversia unei bacterii mezofile la psichrotrofie prin transducție genetică sau iradiere cu UV, precum și mutația indusă de UV de la psichrotrofie la mezofilie.

**Semnificația ecologică a criofiliei** este greu de apreciat în mod direct datorită datelor univoce puțin numeroase. Morita (1976) recomandă să se țină seama de faptul că, practic, cea mai mare parte a biosferei este rece (regiunile polare reprezintă ~14% din suprafața Terrei, iar 90% din mediul marin are temperatura de 5°C sau mai puțin.

Numărul microorganismelor psichrofile este greu de apreciat, deoarece testele de laborator detectează numai celulele metabolic active nu și pe cele în repaus sau muribunde. După Morita (1976), în unele cazuri, numărul lor real este de 13—9700 de ori mai mare decît cel rezultat prin tehnica cultivării. În plus, există un factor de eroare reprezentat de prezența în mediile reci a unor psichrotrofe, precum și a unor mezofile prezente accidental, în general, inactive, reprezentînd o sursă de nutrienți organici pentru alte organisme.

Mediile oceanice, în particular, sînt caracterizate, în plus, prin cantitatea redusă de nutrienți, precum și prin prezența curenților care, producînd modificări de salinitate și/sau presiune, influențează cantitatea de substanță organică. În aceste condiții, criofilia ar permite utilizarea eficientă a nutrienților disponibili.

Unele bacterii criofile sînt bune chitinolitice (chitinoclastice) și pot avea un efect în recircularea și utilizarea chitinei foarte rezistentă la degradare (în stomacul unor pești oceanici au fost găsite $1,5 \times 19^{10}$ bacterii chitinolitice/ml). Semnificația acestei funcții poate fi deosebită, dacă reținem aprecierea lui Zobell și Rickenberg (1938), după care numai copepodele produc anual miliarde de tone de chitină, la care se adaugă multe alte organisme. Unele bacterii chitinolitice produc boli severe („Shell disease", „Burned spot disease", „Rust disease") cu leziuni necrotice ale exoscheletului crustaceelor.

Între funcțiile posibile ale microorganismelor marine criofile au mai fost invocate producerea de vitamină $B_{12}$, de produși asemănători hormonilor, precum și posibilitatea utilizării lor ca hrană pentru organisme mai evoluate.

Între efectele negative are importanță practică deosebită alterarea alimentelor conservate prin frig.

## APA.
## PRESIUNEA OSMOTICĂ

Cantitatea de apă prezentă în diferite medii naturale variază foarte mult.

Disponibilitatea apei pentru diferite activități biologice nu depinde numai de cantitatea ei în mediu, ci este în funcție de o serie de fenomene complexe. Astfel, apa adsorbită pe diferite suprafețe poate fi disponibilă sau

nu, în funcție de gradul de adsorbție și/sau de eficiența cu care microorganismele o pot prelua.

De asemenea, în cazul soluțiilor, substanțele dizolvate devin mai mult sau mai puțin hidratate, și gradul în care o substanță dizolvată este hidratată afectează disponibilitatea apei.

Ținînd seama de intervenția acestor factori s-a convenit că forma cea mai adecvată de exprimare a disponibilității apei și, prin aceasta, posibilitatea de a exprima amploarea stressului impus unei populații de microorganisme este *activitatea apei* (Wa — „water-activity")*. Ea este mare în cazul habitatelor acvatice și scăzută în mediile care conțin cantități mari de substanțe dizolvate, pentru că o parte din apă se leagă de acestea, diminuînd cantitatea de apă disponibilă. Valorile minime și optime ale activității apei au un rol important în aprecierea activității biologice a microorganismelor.

Valorile minime sau limitante ale activității apei (tabelul nr. 13) la care bacteriile se mai dezvoltă sînt esențiale pentru că ele condiționează supraviețuirea acestora în natură.

*Tabelul nr. 13*

**Valorile minime ale activității apei la care pot crește diferite categorii de microorganisme**
(după date din literatură)

| BACTERII | | LEVURI | |
|---|---|---|---|
| *Bacillus cereus var, mycoides* | 0,99 | *Candida utilis* | 0,94 |
| *Pseudomonas fluorescens* | 0,94 | *Saccharomyces cerevisiae* | 0,92 |
| *Enterobacter aerogenes* | 0,97 | *Saccharomyces rouxii* | 0,85 |
| *Bacillus subtilis* | 0,95 | *Torula utilis* | 0,94 |
| *Lactobacillus viridescens* | 0,94 | *Endomyces vernalis* | 0,88 |
| *Salmonella typhimurium* | 0,92 | MUCEGAIURI | |
| *Staphylococcus albus* | 0,88 | *Botrytis cinerea* | 0,93 |
| *Staphylococcus aureus* | 0,86 | *Alternaria citri* | 0,84 |
| *Halobacterium* sp. | 0,75 | *Aspergillus niger* | 0,84 |
| *Micrococcus* sp. | 0,83 | *Aspergillus ruber* | 0,70 |
| *Sarcina* sp. | 0,92 | *Xeromyces bisporus* | 0,60 |

Spre deosebire de levuri și de unele mucegaiuri, bacteriile, exceptînd *Halobacterium* sp. și, în oarecare măsură, *Staphylococcus aureus*, sînt puțin tolerante la activități mici ale apei. Majoritatea microorganismelor necesită pentru un metabolism activ o activitate a apei $\geqslant 0{,}96$. Metabolismul lor încetează la o activitate a apei de 0,60 — 0,65, deși unele microorganisme xerotolerante (celulele cu perete celular gros, sporii, chiștii etc.) pot supraviețui la uscăciune. Prin contrast, bacteriile cu învelișuri celulare fine și forme alungite (leptospire, treponeme etc.) mor foarte repede la uscăciune. În schimb, *Mycobacterium tuberculosis* este foarte rezistent, datorită învelișului parietal lipidic, particularitate importantă pentru supraviețuirea în afara organismelor infectate și pentru transmiterea la alte organisme.

* Spre deosebire de *umiditatea relativă*, care exprimă în meteorologie, *procentual*, raportul dintre cantitatea de apă prezentă în aer, la o temperatură dată, față de cea la care aerul poate fi menținut, dacă este saturat cu apă, activitatea apei este exprimată sub formă de *fracție*. Umiditatea relativă de 90% corespunde unei activități a apei de 0,90. Prin definiție Wa a apei distilate = 1,0.

Microorganismele care trăiesc în medii cu o activitate a apei foarte redusă, datorită prezenței unei concentrații mari de substanțe dizolvate în mediu, extrag cu dificultate apa din soluție, fapt ce determină o încetinire marcată a creșterii (fig. 62).

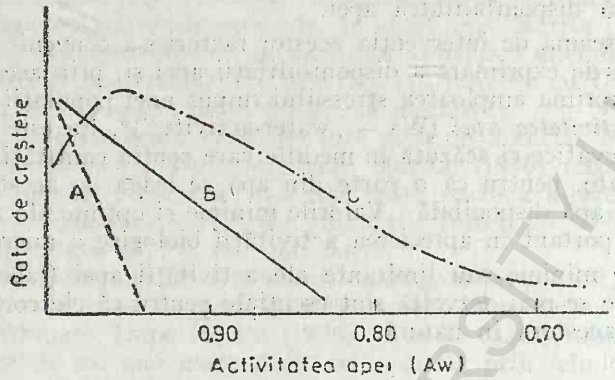



Fig. 62. — Efectul variației activității apei (Au) asupra creșterii microorganismelor. A. Microorganism care crește normal cel mai bine la $A_w$ mari și este inhibat de $A_w$ mici. B. Microorganism osmotolerant (crește bine la $A_w$ ridicat, dar se dezvoltă bine și la $A_w$ ceva mai reduse). C. Microorganism osmofil cu creștere optimă la $A_w$ reduse (după Brock, 1974).

## PRESIUNEA OSMOTICĂ

În mod normal, presiunea osmotică din interiorul celulei bacteriene este ceva mai mare decît cea a soluției reprezentată de un mediu de cultură uzual. Aceasta se datorește faptului că celula conține în stare solvită concentrații mai mari de substanțe organice și minerale pe care le poate reține datorită permeabilității selective a membranei celulare în citoplasmă. Ca urmare, există un flux spontan de apă din mediu, care tinde să pătrundă prin osmoză în celulă pentru egalizarea concentrațiilor intra- și extracelulare de substanțe solvite. De aceea, în condiții normale, celula bacteriană se află într-o stare de turgescență, determinată de forțele de distensie intracelulară, caracteristice, de altfel, tuturor celulelor vii.

Practic, toate organismele dispun de o strategie pentru rezolvarea acestei probleme. Mamiferele au țesuturi și organe (piele, rinichi) care controlează intrarea și eliminarea apei. În plus, cele mai multe celule sînt scăldate într-un lichid cu presiune osmotică egală cu cea intracelulară. Plantele controlează presiunea osmotică ce se modifică pe măsură ce apa pătrunde în celule prin peretele celular celulozic rigid al acestora. Bacteriile recurg la o strategie similară datorită peptidoglicanului (mureina) din structura peretelui celular rigid, greu deformabil, care limitează expansiunea protoplastului rezultată din pătrunderea apei.

În funcție de comportarea lor în medii cu presiuni osmotice, diferite microorganisme pot fi încadrate în una din următoarele categorii (fig. 63):

1) *Microorganisme intolerante* la presiuni osmotice ridicate.

2) *Microorganisme osmotolerante* sau facultativ osmofile, care cresc mai bine la activități ridicate ale apei, dar cresc la fel de bine și la activități mai reduse.

3) *Microorganisme osmofile:* creșterea optimă necesită presiuni osmotice ridicate, respectiv activități reduse ale apei, realizate prin concentrații mari de săruri în mediu (microorganisme halofile) sau de glucide (zaharofile).

Levurile osmofile *(Saccharomyces rouxii, S. mellis, S. rosei, Zygosaccharomyces priorianus, Z. nadsonii, Z. nectarophilus* etc.) sînt prezente frecvent în nectarul florilor (concentrație de zahăr>40%). Nectarul este steril înainte de deschiderea florilor. Contaminarea lui este realizată de insectele nectarofile, care introduc microorganismele și în stup, putînd fi izolate din miere pe medii cu concentrații ridicate de zahăr. Levurile osmofile sînt prezente și pe fructele proaspete, mai ales în regiunea din fruct care corespunde poziției originare a nectarului floral.

Majoritatea levurilor sînt facultativ osmofile. Au fost izolate doar rar mutante obligat osmofile de *S. rouxii*, care cresc filamentos la concentrația de 30% zaharoză și monocelular la concentrații de 60%. Această particularitate sugerează că presiunea osmotică a mediului afectează numărul mare de enzime implicate în sinteza peretelui celular.

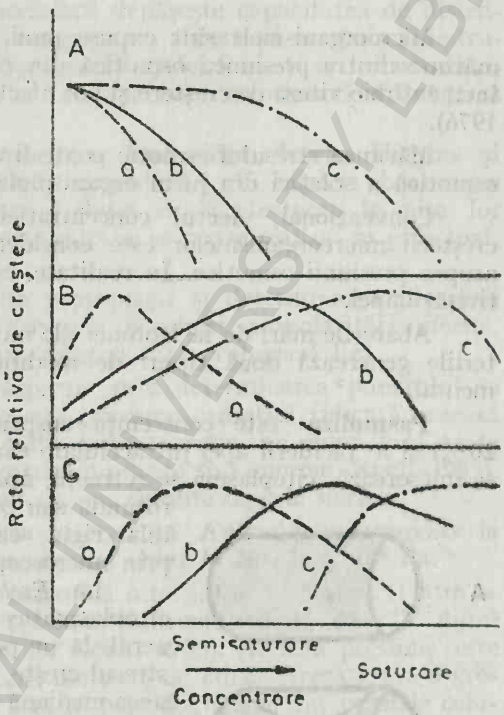



Fig. 63. — Reprezentarea schematică a răspunsului microorganismelor la diferite concentrații de zahăr sau săruri. **A.** Microorganism puternic (a), moderat (b), ușor intolerant (c). **B.** Microorganism facultativ halofil sau zaharofil cu nivel optim scăzut (a), moderat (b) sau ridicat (c). **C.** Microorganism slab (a), moderat (b) sau puternic (c), obligat zaharofil sau halofil (după Ingram, 1957).

**Bazele osmofiliei** sînt încă nelămurite. Multe microorganisme osmofile sintetizează și acumulează intracelular concentrații mari de glicerol, arabitol și alți polioli hidrofili, neîntîlniți la microorganismele neosmofile (Rose, 1976). Acumularea lor în celulă ar crește concentrația apei legate în celula levurilor, diminuînd diferențele de presiune osmotică prin membrana celulară. În plus, microorganismele osmofile obligate pot conține mai multe resturi de acizi grași nesaturați decît tulpinile facultativ osmofile (Koch, 1975).

După Rose (1976), capacitatea membranei citoplasmatice de a se contracta sau de a se extinde pînă la o limită determinată de dimensiunile peretelui celular funcționează ca o barieră în jurul protoplastului. Activitatea ei este influențată de natura lipidelor și a proteinelor membranare. Stabilitatea este maximă în cazul în care fosfolipidele interacționează puternic unele cu altele. Prezența sterolilor mărește considerabil stabilitatea dublului strat fosfolipidic.

În sfîrșit, bacteriile lipsite de perete celular (*Mycoplasma* sp., formele L) evită apariția unor diferențe mari de presiune osmotică, probabil, prin acumularea în celulă, printr-un mecanism necunoscut, a unor concentrații mici de $Na^+$ și $K^+$.

### Șocul osmotic

Microorganismele sînt expuse unui stres osmotic, cînd diferențele de mărime dintre presiunea osmotică din celule și mediu sînt de așa natură încît întîrzie viteza de creștere și pot afecta capacitatea de reproducere (Rose, 1976).

Mărimea stresului osmotic poate fi cuantificată în funcție de presiunea osmotică a soluției din jurul organismului respectiv.

Convențional, efectul concentrației substanțelor dizolvate * asupra creșterii microorganismelor este considerat ca fiind datorat influenței lor asupra presiunii osmotice. În realitate, el se datorează efectului asupra activității apei.

Abaterile mari de la izotonie ale mediului în care sînt suspendate bacteriile generează două tipuri de modificări caracteristice studiate experimental.

**Pasmoliza** este consecința suspendării în medii hipertonice (NaCl 20%) și a pierderii apei intracelulare care trece în mediu. Volumul celulei se micșorează, citoplasma se retractă, apărînd, în cazurile severe, ca o masă rotundă sau ovalară îndepărtate de peretele celular rigid, care poate fi evidențiat ușor chiar prin microscopie fotonică.

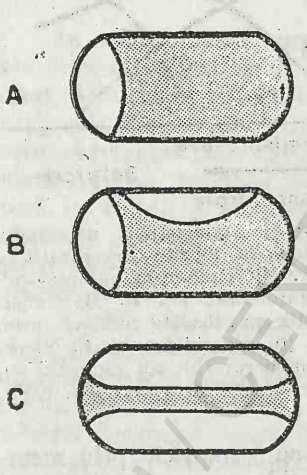



Fig. 64. — Reprezentarea schematică a trei grade diferite de plasmoliză la o bacterie cilindrică. A. Plasmoliză ușoară. B. Plasmoliză extensivă. C. Plasmoliză severă (după Rose, 1973).

La *Escherichia coli*, separarea membranei citoplasmatice de peretele celular începe, în general, la un pol al celulei (fig. 64). Pe măsură ce stresul crește, decolarea acesteia are loc și în regiunea mediană a celulei.

În plasmoliză severă, deși membrana este îndepărtată de peretele celular pe o mare suprafață, ea rămîne atașată de acesta prin unele puncte de legare reprezentate, probabil, la bacteriile Gram-pozitive de acizii lipoteichoici. După producerea plasmolizei are loc o revenire treptată a membranei celulare la fața internă a peretelui celular—*deplasmoliza* — care este determinată de creșterea treptată a concentrației substanțelor dizolvate intracelular, pe măsură ce compușii cu greutate moleculară mică sînt transportați din mediu în organism. Spre deosebire de apă, acești compuși trec, prin membrana celulară, prin procese care implică participarea proteinelor de tran-

* Teoretic este mai corectă exprimarea acestei concentrații în funcție de molalitate (moli/100 g solvent) decît în termeni de molaritate (moli/1000 cm , sol. M), care se modifică cu temperatura. Diferența nu este mare în cazul soluțiilor diluate, dar devine mare în cazul celor concentrate.

sport. Ca urmare, viteza relativă a acestor procese de transport determină diferențele în viteza deplasmolizei (Ingram, 1957; Rose, 1976).

După Hale (1957), bacteriile Gram-negative sînt mai sensibile la plasmoliză decît cele Gram-pozitive și decît levurile.

**Plasmoptiza** este rezultatul expunerii microorganismelor în medii hipotone (0,01 NaCl%). Datorită pătrunderii apei din exterior, turgescența celulei crește pînă cînd presiunea intracelulară depășește capacitatea de distensie a peretelui celular, determinînd dezagregarea structurii acestuia și extruzia conținutului celular în mediu. Protoplaștii astfel formați se lizează datorită apariției unor pori în membrana celulară care favorizează distrugerea lor (Rose, 1976).

**Rolul fiziologic al presiunii interne a bacteriilor.** Koch, Higgins și Doyle (1982), precum și Koch (1985) consideră că celulele bacteriene au forme adaptate la funcțiile care trebuie să le efectueze în nișa lor ecologică. Aprecierea presiunii osmotice interne se poate realiza, în principal, pe două căi:

1) Prin conversia bacteriilor la protoplaști și determinarea presiunii osmotice în funcție de stabilitatea acestora în soluții cu molarități diferite. Presiunea internă este egală cu cea a soluției care protejează liza.

2) Prin tehnica crioscopică, respectiv prin determinarea punctului de îngheț al conținutului extrudat. Această presiune osmotică ridicată creează și o presiune hidrostatică internă mare care, teoretic, ar putea face toate celulele bacteriene sferice. Or, deși forțele implicate sînt enorme (Koch, 1985), bacteriile își păstrează formele caracteristice, diferite de cele sferice.

Rose (1976) apreciază presiunea internă la *Enterobacter aerogenes* la $5—6 \times 10^5$ Pa*, iar la *Staphylococcus aureus* chiar la $20—30 \times 10^5$ Pa.

La *Escherichia coli*, presiunea osmotică internă de 3—5 atm. (1 atm = = 101,325 KPa) corespunde la o presiune hidrostatică de 45—75 lb/in$^2$ (1 lb/in$^2$ = 6,895 KPa)** (Stock, 1977; Koch, 1985). Această presiune este egală cu cea existentă în anvelopa unei biciclete de curse. Aceasta are o grosime de ~ 4 mm, spre deosebire de stratul peptidoglicanic din peretele celulei bacteriene, care are numai 1 nm (0,000001 mm). Rezistența excepțională a peretelui bacterian este consecința legăturilor covalente, care consolidează structura moleculei sacciforme de mureină.

Conform teoriei stresului de suprafață (Koch, 1985), forma bacteriilor poate fi înțeleasă dacă presupunem că peretele celular crește ca răspuns la tensiunea hidrostatică internă, derivată osmotic. Diferitele bacterii au forme diferite pentru că peretele celular crește în regiuni speciale, limitate, de peptidoglican rezistent la stres, care sînt diferite la organismele cu forme diferite. În aceste regiuni, oligomerii de peptidoglican sînt adăugați la structura preexistentă, fără a afecta rezistența anterioară. Regiunile noi adăugate nu sînt de la început sub tensiune, datorită faptului că stresul hidrostatic este suportat de peretele celular vechi. Numai după ce unitatea nou inserată este legată covalent la nivelul mai multor situsuri are loc clivarea specifică

---

* Pa-Pascal = unitate de presiune sau de stress din sistemul internațional, definită ca echivalentă unei presiuni de 1 newton (N)/m$^2$;

1 N = unitate de forță, definită ca forța necesară pentru a imprima unei mase de 1 kg o accelerare de 1 m per secundă (kg/m.s$^2$).

** In$^2$ = inch$^2$ = $6,45 \times 10^{-4}$ m$^2$; lb (pound) = 0,453592 kg.

a peretelui celular vechi. Aceste clivări se petrec în așa fel încît regiunile noi nu mai sînt menținute lax, ci sînt puse sub tensiune și sînt împinse într-o configurație extinsă, producînd prin aceasta creșterea peretelui celular.

În regiunile în care peretele celular nu crește, deformarea produsă de presiunea hidrostatică este minimă.

## MECANISMELE DE REGLARE OSMOTICĂ LA BACTERII. SUBSTANȚELE OSMOPROTECTOARE

**„Multe organisme au învățat o regulă simplă de chimie pentru a trăi într-o lume deficitară în apă disponibilă. Ele au dezvoltat mecanisme sofisticate pentru a-și echilibra presiunea osmotică cu cea a mediului, evitînd deshidratarea prin preluarea sau sinteza unor molecule care acționează ca agenți de echilibrare osmotică"**

D. Le Rudulier

Adaptarea celulelor la șocul osmotic este o problemă fundamentală pentru protecția organismelor față de efectele letale ale uscăciunii. Fenomenul a fost studiat inițial la plante dată fiind importanța uscăciunii, precum și a salinității crescute în zonele irigate pentru agricultură. Cu această ocazie, Yancey și colab. (1982) au emis ipoteza că unele substanțe, ca glicocolbetaina, prolinbetaina și prolina, ar avea un rol osmoprotector. Acumulîndu-se în celulele vegetale, ele ar echilibra presiunea osmotică intracelulară, în raport de cea a mediului, protejînd plantele de efectele negative ale secetei.

**Reglarea osmotică la bacterii.** Studiile efectuate pe *Escherichia coli* au evidențiat complexitatea proceselor de osmoreglare și bazele genetice ale desfășurării lor.

1) Primele cercetări au fost orientate asupra *porinelor*, proteine din membrana externă bacteriană, care formează pori de difuzie pasivă ce permit compușilor hidrofili cu greutate moleculară mică să traverseze această membrană.

*Osmolaritatea mediului* afectează puternic raportul dintre porinele *Omp C* și *Omp F*. Astfel, gena *ompC* este exprimată cînd celulele sînt menținute într-un mediu hiperosmotic, iar gena *ompF* în cele hipoosmotice (Mizuno și colab., 1983). După aceste date, în membrana externă a *E. coli* ar exista o *proteină osmosensibilă* („Osmotic sensor protein"), care „simte" starea osmotică a mediului. Acționînd prin intermediul unei a doua proteine de reglare din citoplasmă, ea ar amorsa o cascadă de mecanisme de reglare, care determină exprimarea selectivă a genelor pentru proteine.

2) Un alt mecanism este asociat cu rolul esențial al $K^+$ pentru osmoreglare la *E. coli*. Și în acest caz ar interveni o proteină din membrana externă bacteriană, prin intermediul căreia ar fi reglate funcționarea genelor cu rol în transportul $K^+$ prin membrană, în funcție de puterea osmotică a mediului.

3) Un alt set de proteine osmosensibile membranare, după polimerizare și acumulare intracelulară, ar modula biosinteza unei clase speciale de molecule oligozaharidice, în funcție de condițiile din mediu. Aceste molecule ar avea la *E. coli* un rol osmoprotector.

4) *Genele de toleranță osmotică.* Înțelegerea mecanismelor de osmoreglare la bacterii a progresat odată cu descoperirea unei noi clase de gene *osm* („Osmotic tolerance"), care codifică producerea și acumularea unor molecule ce protejează celula și constituenții ei de deshidratare. Odată cu aceasta, s-a evidențiat faptul că substanțele bănuite ca osmoprotectoare la plante se comportă cu aceeași funcție și la bacterii (Le Rudulier și Valentine, 1982, 1984).

Dintre genele implicate în adaptarea la stress osmotic au fost identificate următoarele: *proAB* (supraproducție de prolină), *betIosm* (cholină, betainglicocol), *kdp* (înglobarea $K^+$), *ompC*, *ompF*, *ompR*, *envZ* (sinteza și reglarea producerii porinelor), *proU* (prolinuptake, înglobarea prolinei).

**Substanțele osmoprotectoare** identificate la *E. coli* (glicocol betaina, cholina, betain aldehida, trimetil-α-aminobutiratul, prolina și prolina betaina) (fig. 65) au cîteva particularități speciale:

1) o solubilitate extrem de mare în apă (pentru prolină și glicocol-betaină de ~ 14 kg substanță per kg de apă);

2) influențează structura și stabilitatea proteinelor;

3) după adăugarea lor în mediile de cultură permit dezvoltarea *E. coli* și a altor bacterii enterice, în condiții total inhibitoare din punct de vedere osmotic (la concentrații NaCl > 0,8 M).

Funcția lor osmoprotectoare s-ar exercita prin acumulare intracelulară în cantități proporționale cu puterea osmotică a mediului extern. Astfel, la concentrații externe mari (1 M NaCl), *E. coli* concentrează de o sută de mii de ori mai multă glicocol betaină. A fost evidențiată, de asemenea, o cale de modulare osmotică a metabolismului cholinei și glicocol betainei la *E. coli* (fig. 65), care ar controla atît producerea, cît și înglobarea substanțelor osmoprotectoare în funcție de particularitățile mediului.

În felul acesta, după Le Rudulier, în cursul stressului osmotic sever constituenții celulari ar fi efectiv „scăldați" într-o soluție concentrată de osmoprotectori, care pot ajunge la concentrații > 1 M, echilibrînd presiunea osmotică intracelulară față de cea a mediului înconjurător și împiedicînd astfel pierderea de apă. Acest proces este efectiv numai în prezența unui stress osmotic, care ar declanșa inducția sau activarea unor funcții de înglobare, sinteză și concentrare a substanțelor osmoprotectoare. În felul acesta, *E. coli* și, probabil, toate bacteriile (fenomenul a fost evidențiat la toate bacteriile enterice testate) s-ar comporta ca un osmometru miniatural, care „simte" și răspunde la modificările osmotice ale mediului.

Descoperirea genelor *osm* și confirmarea funcției acelorași substanțe protectoare la bacterii și la plante au o importanță deosebită pentru ingineria genetică și agricultură, deschizînd calea unor tehnici noi pentru creșterea toleranței la uscăciune și la săruri a plantelor de cultură.

Pe plan global, după Le Rudulier și colab. (1984), plantele terestre și cele acvatice ar reprezenta sursa majoră de betaine cu rol de osmoprotectori în biosferă.

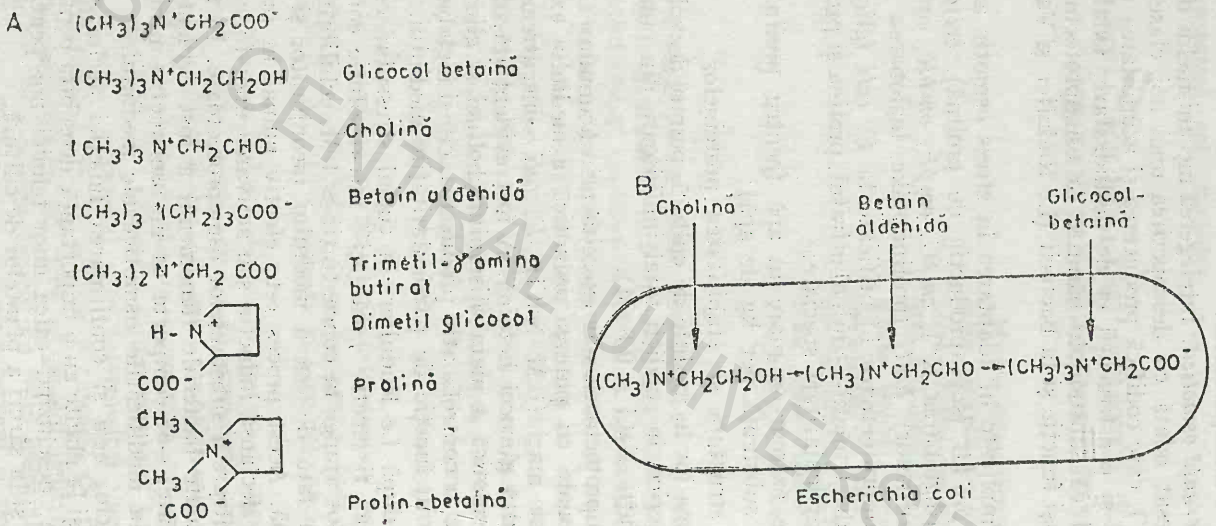



Fig. 65. — Structura chimică a principalelor substanțe osmoprotectoare pentru *Escherichia coli* și alte bacterii enterice (A), Metabolismul cholinei și betain-glicocolului în *Escherichia coli*, ca exemplu de cale modulată osmotic (B) (după Le Rudulier, 1984).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# PRESIUNEA HIDROSTATICĂ. MICROORGANISMELE BAROFILE

În anumite medii acvatice (mări și oceane), presiunea hidrostatică înregistrează mari diferențe de valoare între straturile superficiale și cele profunde sau abisale. În general, se apreciază că, în medie, presiunea hidrostatică crește linear cu adîncimea, cu 1 atm la fiecare 10 m adîncime. La adîncimi foarte mari (cota de adîncime de 10 860 m), presiunea hidrostatică este practic mai mare (Morita, 1976) decît este indicat de regula menționată, datorită densității crescute a apei de mare, provocată de compresiunea de către straturile de apă superioare. Presiunea hidrostatică afectează echilibrul chimic al mediului și are ca urmare scăderea valorilor de pH ale apei marine, datorită modificării solubilității nutrienților, ca, de exemplu, a $HCO_3^-$.

Deși microorganismele rezistă frecvent la presiuni hidrostatice mai ridicate, presiunile foarte mari pot avea pentru unele un efect letal. În funcție de comportarea lor față de diferite presiuni hidrostatice microorganismele pot fi grupate în mai multe categorii:

1) **Microorganismele barofile** cresc la presiuni ridicate, uneori depășind 400—500 atm. Unele sînt barofile absolute, în sensul că nu cresc la presiuni mici, ci numai la presiuni ridicate.

2) **Microorganismele barofobe**, care nu rezistă la presiuni ridicate.

3) **Microorganismele barotolerante** suportă presiuni moderat ridicate. După Jannasch și Wirsen (1984), ele diferă de barofile prin faptul că acestea din urmă cresc mai bine la presiuni mari decît la presiunea normală (fig. 66).

4) **Microorganismele barodure**, rezistente la presiuni foarte mari.

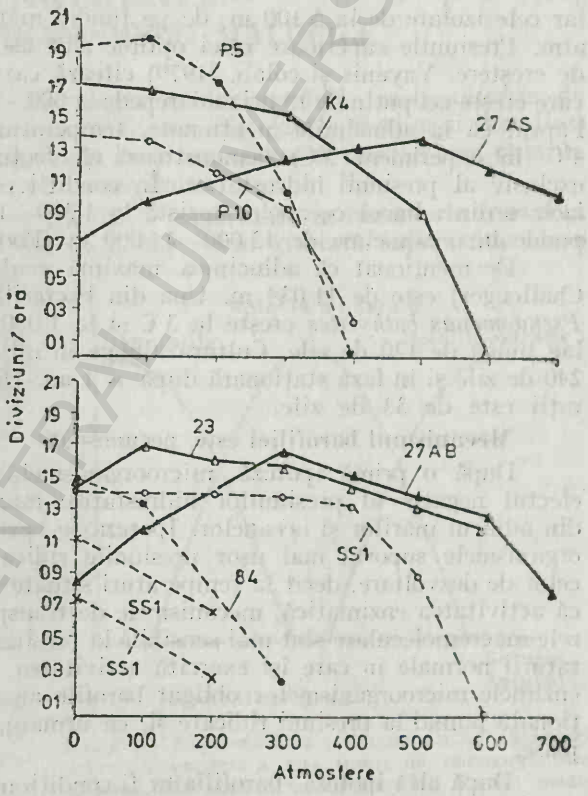



Fig. 66. — Viteza de creștere a bacteriilor marine barotolerante și barofile în raport de presiunea hidrostatică. **A.** Bacteriile au fost izolate din coloana de apă de la 1 410 ($P_5$ și $P_{10}$) și 4 000 ($K_4$), și dintr-un amfipod de pe fundul oceanului de la 5 100 m (27 AS). **B.** Bacteriile au fost izolate din coloana de apă de la 1 850 m (SS 1), 2 600 m (84) și 4 900 m (23), și de la alt amfipod de la 5 100 m (27 AB). Temperatura de incubație a fost de 3°C (după Jannasch și Wirsen, 1984).

5) **Microorganismele euribare,** care se dezvoltă la diferențe mari de presiune (1—600 atm).

6) **Microorganismele stenobare,** care suportă numai diferențe mici de presiune hidrostatică.

*Efectul presiunilor ridicate* este relativ puțin studiat. În cazul bacteriei *Serratia marcescens,* expunerea la presiuni ridicate este urmată de formarea de filamente foarte lungi. Transferarea la presiuni reduse este urmată de divizarea filamentului la celule normale.

Presiunea de 100—500 atm întîrzie creșterea și diviziunea la *Escherichia coli.* Faza de lag este, în special, mult prelungită. La presiuni ridicate conținutul biomasei în proteine este același ca la o atmosferă, în timp ce cantitatea de ARN crește, iar ADN scade.

*Microorganismele barofile* populează în special adîncul mărilor (—1 500 m), precum și regiunile abisale. Ele sînt izolate curent de la adîncimi cuprinse între 1 707 și 5 952 m (San Diego, Hawaii). Tulpinile izolate din probe de apă colectate de la 4 900 m cresc cel mai bine la 200—300 atm, iar cele izolate de la 5 100 m, de pe fundul mării, cresc optim la 400—500 atm. Presiunile superioare celei optime sînt asociate cu diminuarea vitezei de creștere. Yayanis și colab. (1979) citează cazul unui spiril marin barofil, care crește cel puțin de 15 ori mai repede la 300—400 de atm. decît la 1 atm. Faptul că la adîncimile menționate, temperatura este constantă între 2 și 4°C (în experiment 3°C) demonstrează că efectul înregistrat este rezultatul exclusiv al presiunii hidrostatice. În condiții experimentale, unele bacterii izolate din adîncul oceanelor rezistă la 1 300—1 400 atm, ceea ce ar corespunde la o adîncime de 13 000—14 000 m (Pool, 1990).

De menționat că adîncimea maximă evidențiată în natură (expediția Challenger) este de 11 034 m. Una din bacteriile izolate în aceste condiții, *Pseudomonas bathycetes* crește la 3°C și la 1 000 atm, după o perioadă de lag lungă de 120 de zile. Cultura ajunge în mijlocul fazei logaritmice după 240 de zile și în faza staționară după ~ 1 an. Durata calculată a unei generații este de 33 de zile.

**Mecanismul barofiliei** este necunoscut.

După o primă ipoteză, microorganismele barofile ar fi protejate de efectul negativ al presiunilor hidrostatice mari, de temperaturile scăzute din adîncul mărilor și oceanelor. Ipoteza se bazează pe observația că microorganismele suportă mai ușor presiunile ridicate la temperaturi inferioare celor de dezvoltare, decît la temperaturi situate în zona de creștere. Probabil că activitatea enzimatică, mecanismele de transport ale nutrienților și sintezele macromoleculare sînt mai sensibile la presiuni ridicate în limitele temperaturii normale în care își exercită activitatea. După Kim și ZoBell (1972) enzimele microorganismelor obligat barofile au o configurație terțiară funcțională numai la presiuni ridicate și, ca urmare, ar fi inoperante la presiuni joase.

După altă ipoteză, barofilia ar fi condiționată de prezența, în structura membranelor celulare, a unor lipide tot mai puțin saturate pe măsură ce presiunea hidrostatică a mediului natural crește. Acestea ar avea rolul de a menține fluiditatea normală a membranelor, asigurînd transportul nutrienților și funcționalitatea lor.

După Yayanos și colab. (1989), eubacteriile, care trăiesc normal în adîncul mărilor, au o genă reglată de presiunea hidrostatică. Ea codifică exis-

tența unei proteine ce pare să aibă rol în formarea unor canale prin membrana celulară bacteriană. Această genă este exprimată la 280 atm (nu însă și la presiuni mici). Datorită acestui mecanism, bacteriile și-ar modifica dimensiunea și numărul canalelor transmembranare, ca răspuns la creșterea presiunii, înfruntînd astfel difuzia glucidelor și a altor nutrienți prin peretele celular.

**Semnificație ecologică.** Presiunea hidrostatică reprezintă un parametru major în mediul marin și oceanic, deoarece toate organismele marine, cu excepția celor care trăiesc la suprafață, sînt expuse la diferite grade de presiune, în funcție de adîncime și de salinitate.

Bacteriile barofile au un rol important în descompunerea plantelor și animalelor moarte, care cad la fundul oceanelor. Ele participă în acest mod la reciclarea materiei organice în natură.

## SALINITATEA. MICROORGANISMELE HALOFILE

Mediile naturale oferă microorganismelor condiții foarte diferite de salinitate, de la cele cu concentrații foarte mici (apele riurilor și lacurilor) pînă la cele cu concentrații mari ale lacurilor sărate și mărilor sau chiar la cele ce reprezintă adevărate soluții saturate.

În sol, salinitatea suferă fluctuații importante în funcție de frecvența și de cantitatea ploilor sau de uscăciune, fiind afectată suplimentar de o serie de factori proprii acestui mediu complex.

Mediul cu salinitatea cea mai constantă este reprezentat de organisme și de celule care beneficiază de mecanisme precise de reglare ionică.

Ca regulă generală, prezența unor concentrații mari de săruri inhibă creșterea celor mai multe microorganisme obișnuite, datorită pierderii apei intracelulare și perturbării echilibrului ionic normal (Larsen, 1973).

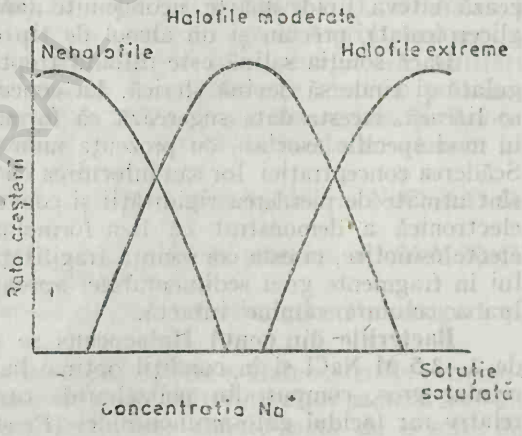



Fig. 67. — Reprezentarea diagramatică idealizată a ratei de creștere a trei tipuri de microorganisme în funcție de concentrația ionilor de Na din mediu (după Brock, 1974).

În raport cu concentrația de $Na^+$ sau respectiv de săruri tolerate, microorganismele pot fi grupate în trei categorii: nehalofile sau halofobe, halofile moderate și halofile extreme (fig. 67). Evident, clasificarea nu este absolut riguroasă, deoarece există unele microorganisme halofile moderate, care se pot dezvolta la concentrații saline mici, după cum există și microorganisme de apă dulce (halotolerante), care se pot dezvolta în apa de mare.

**Microorganismele halofile moderate** sînt, în general, bine adaptate la limitele de salinitate ale apei de mare (de regulă, echivalente cu 3,5% NaCl, la care se adaugă cantități mici de K, Ca, Mg, sulfați, carbonați). Ele cresc slab la salinități inferioare sau superioare acestor limite.

**Microorganismele halofile extreme obligate** * trăiesc în condiții de mediu foarte neobișnuite, la limita granițelor fiziologice pentru viață. Sînt reprezentate de bacteriile din genul *Halobacterium* și *Halococcus*, de bacteriile „pătrate" și de alge din genul *Dunaliella*.

**Bacteriile din genul Halobacterium** *(H. halobium, H. salinarium, H. cutirubrum)*, cel mai mult studiate, sînt halofile extreme. Se dezvoltă la o concentrație minimă de 2,5—3 M NaCl și respectiv la concentrația optimă de 4—5 M NaCl, la care se adaugă 0,1—0,5 M $Mg^{2+}$.

Se dezvoltă foarte lent (durata unei generații este > 7 ore), primele colonii colorate în roșu viu pînă la oranj apărînd după cîteva zile. Ele conțin pigmenți carotenoizi cu rol protector față de lumină (mutantele incolore cresc mai lent la lumină).

Sînt prezente în natură în zonele de mare concentrație salină (Great Salt Lake, bazinele de extracție a sării din mare, în general intens expuse la soare, deci în condiții în care celulele pigmentate au avantajul de a fi mai bine adaptate, în pește sărat și alte alimente conservate prin sărare etc.), în soluții saline saturate (~ 36% NaCl).

*Halobacterium halobium*, recoltat din medii naturale sau cultivat în prezența a 25% NaCl, apare pe microelectronografii sub forma unor bastonașe rectangulare subțiri. Nu are un perete celular propriu-zis și nici mureină, ci numai un înveliș foarte subțire și fragil, alcătuit din proteine acide (~ 75%), lipide (~ 25%) și cantități infime de glucide aminate (0,5—1,5%). Sintetizează cîteva lipide foarte neobișnuite (analogi de tip di-0-alkil, fosfatidil glicerofosfat), precum și un alcool de tip dihidrofitil.

Dacă soluția salină este diluată treptat, *H. halobium* ia o formă neregulată și tinde să devină sferică. La concentrații < 10% structurile sferice se lizează. Aceste date sugerează că forma bacilară a acestei bacterii este în mod specific asociată cu prezența unor concentrații mari de $Na^+$ și $K^+$. Scăderea concentrației lor sau înlocuirea cu $NH_4^+$, $Li^+$ sau cu cationi divalenți sînt urmate de pierderea rigidității și conversia la forme sferice. Microscopia electronică a demonstrat că liza formelor sferice nu este determinată de efecte osmotice, ci este consecința fragilității învelișului celular și dispersării lui în fragmente greu sedimentabile, aproape solubilizate, în timp ce membrana celulară rămîne intactă.

**Bacteriile din genul Halococcus** se dezvoltă la concentrația minimă de 2—2,5 M NaCl și în condiții optime la 3,4—4,5 M NaCl. Au un perete celular gros, compus din polizaharide care conțin resturi dintr-un glucid relativ rar (acidul gulosaminouronic) (Reistad, 1975). Acest perete celular le permite să reziste la șocul osmotic puternic, cînd sînt plasate în medii diluate.

Cele mai multe date pledează pentru absența peptidoglicanilor (mureina), deoarece aminoacizii și hexozaminele reprezintă numai 7—15% din greutatea uscată a peretelui celular (Rose, 1976).

---

* Sintagma *obligat halofil* este *per se* ilogică (iubitor obligat de săruri). De aceea, Horowitz și Wlassowa (1961) propun termenii de *halob* pentru microorganismele obligat halofile și menținerea termenului de halofil numai pentru cele facultative.

**Bacteriile „pătrate"** au fost izolate inițial de Walsby (1980), din niște bazine cu apă hipersalină („Sebkha") din Peninsula Sinai, unde reprezintă peste 50% din bacteriile asociate cu depozitele de sare. Par să fie ubicvitare în mediile hipersaline, deoarece au fost depistate și în regiunea Eilat (Israel), precum și la Guerrero Negro și La Paz (Baja California Mexico), de către Stoeckenius (1981). În aceste regiuni nu pot fi evidențiate decît în mijlocul verii pe crestele de sare cînd salinitatea este de 210% (total săruri dizolvate). Iarna, cînd soluția salină este diluată de apa introdusă din mare, pot fi găsite numai pe cristalele de sare de pe marginea bazinelor.

Au forma de pătrate cu latura de 1,5—11 μm și o grosime inegală, mai mică în regiunea centrală (0,1 μm) decît la periferie (0,2—0,5 μm). Sînt acoperite de un perete celular, alcătuit din subunități dispuse în aranjamente regulate de tip hexagonal sau tetragonal. Arhitectura peretelui celular este determinantă pentru forma celulei. Conțin numeroase vacuole cu gaze, dispuse în regiunea periferică a celulelor. Ele apar strălucitoare la microscopul cu contrast de fază și dispar la presiune.

Bacteriile „pătrate" pot apărea izolate sau sub formă de placarde asemănătoare colițelor de timbre poștale, alcătuite din 8—16 celule, la care se văd net planurile de diviziune.

Kessel și Cohen (1982) consideră că avantajul ecologic principal al bacteriilor „pătrate" sau rectangulare derivă din lipsa totală a presiunii de turgor în celulă, care o menține ca un microorganism „turtit" puțin influențat de salinitatea extremă a mediului.

După Parkes și Walsby (1981), bacteriile „pătrate" fac parte din genul *Quadra*, aparținînd grupului *Archaebacteria*.

**Algele din genul Dunaliella** (*D. salina*, *D. tertiolecta*, *D. viridis* etc.) evită stressul produs de diferența mare de presiune osmotică printr-un mecanism cu totul particular: întrucît nu pot îngloba $Na^+$, sintetizează cantități mari de glicerol, care împiedică crearea unor diferențe mari de presiune osmotică în raport cu mediul extern (Rose, 1976). După Borowitzka și Brown (1974), cantitatea de glicerol produsă și reținută intracelular variază în raport direct cu concentrația NaCl din mediu.

*D. viridis* este halofilă extremă; se dezvoltă în medii cu NaCl 4,25 M și conține 4,4 mol glicerol/$kg^{-1}$.

*D. tertiolecta*, halofilă moderată, se dezvoltă în prezența a 1,36 M NaCl și acumulează numai 1,4 mol glicerol/$kg^{-1}$.

Pe lîngă efectul compensator al șocului osmotic, glicerolul asigură și funcția normală a enzimelor.

**Mecanismele moleculare ale halofiliei extreme.** Halobacteriile extremofile nu prezintă nici una din problemele inerente cultivării altor bacterii într-un mediu hipersalin. Această particularitate este condiționată de o serie de factori:

1) Cercetările experimentale au evidențiat un fapt cu totul neașteptat: concentrația intracelulară a sărurilor este la fel de mare sau poate chiar mai mare decît în mediu.

2) Compoziția sărurilor din celulă este *deosebită* calitativ de cea din mediu: în timp ce mediul de cultură conține de cîteva sute de ori mai mult $Na^+$ decît $K^+$, concentrația $K^+$ în celulă este de cîteva ori mai mare decît cea a $Na^+$. Deși halobacteriile au doar nevoi minime de $K^+$ pentru meta-

bolism, ele dispun de un mecanism de acumulare a acestuia în celule pînă la limita de solubilitate a sărurilor de K în apă.

3) Dezvoltarea optimă a halobacteriilor necesită, în plus, concentrații mari (pînă la 100 M $Mg^{2+}$), pe lîngă complementul de ioni metalici prezenți doar ca urme (Larsen, 1973). O concentrație globală de săruri atît de ridicată în interiorul celulelor implică existența unor ultrastructuri și structuri moleculare capabile să funcționeze în soluții saline saturate sau aproape saturate.

Într-adevăr, după cum s-a demonstrat, toate structurile investigate au fost găsite stabile și biologic active numai în prezența soluțiilor saline mai concentrate:

— În caz de diminuare a concentrației sărurilor, învelișul celular este dezorganizat și fragmentat pînă la solubilizare în mediu.

— Ribosomii sînt stabili și funcționali numai în prezența unei soluții ce conține 4 M KCl și au nevoie pentru stabilizare de o concentrație de $Mg^{2+}$ de 10—100 de ori mai mare decît *Escherichia coli*. În absența acestora subunitățile se disociază.

4) În timp ce majoritatea proteinelor izolate din bacteriile nehalofile sînt relativ neutre, totalitatea proteinelor membranare și ribosomale provenite de la halofile conțin un număr important de aminoacizi acizi (un excedent mediu de > 10% moli față de cei bazici).

5) Studiul a peste 30 de enzime izolate de la halofile a arătat marea lor toleranță la săruri (fig. 68). Prezența acestora în concentrație mare ar asigura starea de pliere a lanțului polipeptidic corespunzătoare formei active

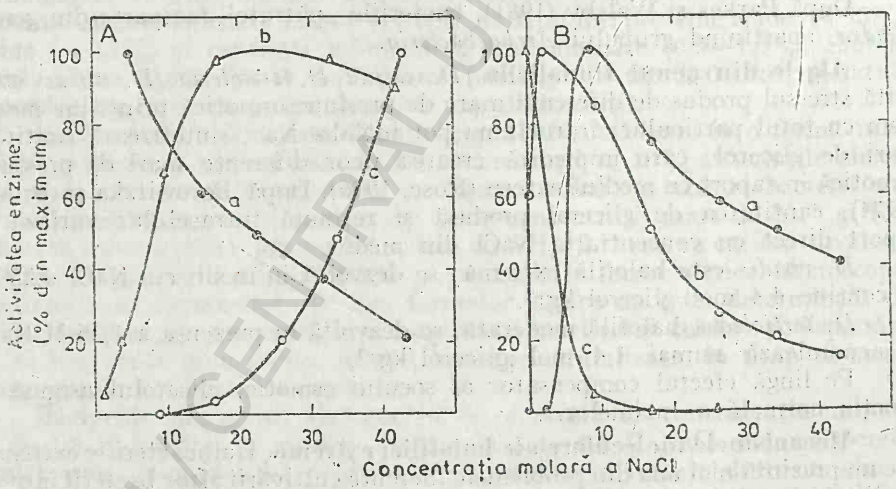



Fig. 68. — Efectul NaCl asupra activității enzimelor de la *Halobacterium halobium*. A. Răspunsul cistein-desulfhidrazei, una dintre cele mai puțin halofile, active încă la 4,3 M (25% NaCl) (a) : curba citocrom-oxidazei, inactivă în absența NaCl (b) și a NADH-dehidrogenazei inactivă în absența NaCl, dar cu activitate maximă la concentrații mari de sare. B. Efectul NaCl asupra malat-dehidrogenazelor de la *H. halobium* (a), de la o bacterie halotolerantă (b) și din ficat (c) (după Larsen, 1974).

și menținerea acestei conformații. Cationul din molecula de sare neutralizează excesul de încărcătură negativă, înlocuind o funcție îndeplinită la nehalofile de interacțiunile covalente. În cazul diluării soluției saline, forțele repulsive determină deplierea, denaturarea și pierderea activității enzimatice.

**Apariția halofilelor extreme.** Mai mulți cercetători au emis ipoteze conform cărora halofilele extreme ar putea apărea din halofile moderate marine în urma unui proces de adaptare. Aceste ipoteze sînt infirmate, luîndu-se în calcul numai caracterul acid al proteinelor (probabil, particularitatea cea mai legată de halofilie și mai decisivă), deși nu unica.

Presupunînd existența a numai $10^3$ cistroni esențiali activi, tranziția de la proteinele neutre la cele acide necesită $10^4$ evenimente mutaționale. Or, o asemenea evoluție în medii naturale s-ar realiza de-a lungul unei perioade de timp foarte îndelungate și este considerată ca puțin probabilă.

În concepția actuală, halofilia extremă este o caracteristică genetică și nu o adaptare fiziologică. De altfel, încercările de adaptare experimentală prin mutageneză nu au reușit.

Bacteriile halofile fac parte din grupul *Archaebacteria*.

## ACIDITATEA ȘI ALCALINITATEA

Cunoașterea condițiilor optime de pH necesare pentru creșterea și multiplicarea microorganismelor sau pentru producerea anumitor substanțe utile (biomasă, enzime, metaboliți secundari etc.) este o problemă de importanță esențială în microbiologie.

Cele mai multe microorganisme cresc la valori de pH cuprinse între 5,0 și 9,0. Între aceste limite, fiecare microorganism are un pH optim. În general, bacteriile se multiplică în limite mai restrînse de pH (diferențe de 3—4 unități), în timp ce algele eucariote se dezvoltă la diferențe mari (pînă la 8 unități de pH).

Și în acest caz există microorganisme extremofile.

*Microorganismele acidofile* sînt caracterizate, după Harrison jr. (1984), prin capacitatea de a crește optim la pH $\leqslant$ 3,0. Definiția exclude unele bacterii, ca, de exemplu, *Thiobacillus intermedius*, care acidifică mediul la pH $<$ 3,0, dar nu cresc la acest pH. Cele mai multe bacterii acidofile cresc bine la pH 2,0 și slab la pH 5,0 sau $>$ 5,0.

*Thiobacillus thiooxydans*, care utilizează sulful ca sursă de energie, acidifică mediul în care crește și supraviețuiește la 7% $H_2SO_4$. Din aceeași categorie fac parte și bacteriile *T. ferrooxydans* și *Leptospirillum ferrooxidans*, care utilizează Fe ca sursă de energie, precum și unele heterotrofe acidofile, ca *T. acidophilus*, *Aconitium velatum* și *Acidiphilium cryptum*.

Unele microorganisme cresc în condiții de aciditate sau de alcalinitate extreme. Astfel, *Acidianus infernus* crește la pH 1,0 și la 96°C, *Saccharomyces guttutata*, la pH 1,0—2,0 (în stomacul de iepure), iar alga *Cyanidium caldarum* are pH optim 2,0.

Prin contrast, *Bacillus circulans* și *Streptococcus faecalis* cresc la pH 10,0—11,0, iar *Plectonema nostocorum* la pH 13,0 (cel mai ridicat, descris de Geiger și colab., 1965).

Indiferent de valorile de pH ale mediului ambiant, conținutul intracelular este apropiat, totdeauna, de neutralitate, condiție necesară pentru menținerea intactă a compușilor sensibili la acizi (ADN, ATP, clorofile etc.) sau la alcali (ARN, fosfolipide etc.). În cazul bacteriilor care acidifică mediul înconjurător s-a demonstrat că acest fenomen se realizează fie prin împie-

dicarea intrării $H^+$, fie prin expulzarea lor imediat după ce au pătruns în celulă.

*Importanța practică.* Unele bacterii acidofile *(Thiobacillus)*, prezente în apele de mină și în izvoarele acide, sînt folosite în instalații industriale pentru solubilizarea sau leșierea („leaching") metalelor neferoase din zăcămintele sărace în minereu. Sînt, de asemenea, agenți activi pentru desulfurizarea cărbunilor și decontaminarea reziduurilor industriale.

Microorganismele acidofile exercită un rol coroziv asupra conductelor metalice sau de beton. Dintre aplicațiile utile sînt de menționat aplicațiile în industria alimentară (oțet, kefir, lapte acidulat etc.).

Cunoașterea valorilor optime de pH are o importanță primordială în tehnica microbiologică, mediile de cultură avînd nevoie de menținerea la un pH optim și constant pentru creștere. „Tamponarea" cu acizi sau cu baze slabe, care preiau sau cedează $H^+$ pe măsură ce concentrația $H^+$ din mediu se modifică, asigură un nivel aproximativ constant al valorilor de pH.

## MICROORGANISMELE ALCALIFILE

**„Enzimele și sistemele microbiene ale alcalifilelor și halofilelor extreme pot avea de jucat un rol spectaculat și pot oferi avantaje distincte față de sistemele actuale".**

W. D. Grant
W. E. Mwatha
B. E. Jones

Aceste microorganisme reprezintă un grup heterogen din punct de vedere sistematic, avînd drept caracteristică principală capacitatea de dezvoltare optimă la valori de pH mai mari de 8,0 (uzual între 9,0 și 10,0). Cu puține excepții (alge eucariote), sînt organisme procariote (eubacterii, cianobacterii și cîteva archaebacterii).

Sînt larg răspîndite în natură, fiind găsite aproape în orice mediu, chiar dacă condițiile de pH ale acestuia nu sînt în mod special alcaline. Prezența lor în mediile neutre sau acide este revelatoare pentru posibilitatea unei alcalinități trecătoare, cel mai adesea produsă în activități biologice (amonificare, reducerea sulfaților etc.) (Langworthy, 1978). Sînt cel mai frecvent întîlnite în mediile alcaline de tipul lacurilor eutrofizate cu conținut mare de $Na_2CO_3$ și în apele freatice („Groundwater") bogate în $Ca(OH)_2$, din anumite regiuni ale lumii (Grant, Mwatha și Jones, 1990).

Microorganismele alcalifile obligate nu cresc la pH neutru.

Cele mai stabile condiții naturale de alcalinitate sînt asigurate prin contribuția asociată a factorilor climatici, geografici și geologici. În plus, unele modalități de poluare cu reziduuri industriale (fabrici de ciment, hîrtie, prelucrarea pieilor animale ș.a.) pot determina alcalinizări mai mult sau mai puțin persistente.

Investigațiile ecologice efectuate în ultimii ani au dus la caracterizarea a două tipuri de medii naturale alcaline, capabile să asigure dezvoltarea microorganismelor alcalifile.

**Lacurile alcaline („Soda lakes") cu conținut redus de $Ca^{2+}$.** În general puțin studiate, din cauza inaccesibilității lor, sînt caracterizate prin prezența unor cantități mari de carbonat de Na sau complexe ale acestuia, formate prin concentrare datorită evaporării. Sînt, în același timp, medii bogate în săruri datorită aceluiași mecanism.

Există mai multe ipoteze privind sursa de carbonat.

Cea mai simplă ipoteză presupune cauze geologice, respectiv proveniența din roci, în absența unor cantități semnificative de $Ca^{2+}$ și $Mg^{2+}$ în mediul respectiv. În regiunile de suprafață se adaugă producerea de $CO_2$ printr-o activitate biologică ce determină apariția unei soluții de bicarbonat/carbonat, care „spală" mineralele din structura geologică înconjurătoare. În același timp, concentrarea ionilor prin evaporare duce la o schimbare în echilibrul $CO_2$/bicarbonat/carbonat.

În situația în care concentrația $Ca^{2+}$ și $Mg^{2+}$ depășește pe cea a $CO_3^{2-}$, carbonatul este îndepărtat din soluție, care nu este alcalinizată. Așa se întîmplă în cele mai multe ape freatice, care, fiind frecvent saturate cu $Ca^{2+}$, duc la precipitarea de calcită ($CaCO_3$), asociată adeseori cu magnezita ($MgCO_3$) și dolomita $MgCa(CO_3)_2$.

În cazurile în care concentrația $CO_3^{2-}$ este mai mare decît cea a $Ca^{2+}$ și $Mg^{2+}$ apare alcalinitatea sub formă de $NaCO_3$, datorită prezenței $Na^+$ ca un cation dominant.

Formarea acestui tip de lacuri alcaline, mediu ideal pentru microorganismele alcalifile, a fost studiată în mai multe cazuri. Unul din studiile cele mai complexe se referă la lacurile din regiunea Rift Valley africană (la aproximativ 200 km de Nairobi), realizat de Jones, Engster și Rettig (1977). El se referă în particular la lacurile Magadi și Natron, cu o salinitate variind în funcție de anotimp și de regiune între 5 și 30% greutate/volum și un pH alcalin constant cu valoarea 10,0—11,5. Regiunea conține în mod caracteristic puțini $Ca^{2+}$ și $Mg^{2+}$ și mult $Na^+$. Raportul $Na_2CO_3$/NaCl este de 2/1. Deși figura 69 se referă la acest caz particular, ea poate servi pentru a înțelege complexitatea fenomenelor, diferitele interacțiuni și mecanismele implicate în funcționarea lacurilor saline alcaline.

**Microorganismele alcalifile** prezente sînt predominant fotosintetizante, care produc „înfloriri" sezoniere sau permanente. Datorită pigmenților lor, lacurile sînt colorate în verde, oranj sau roșu (Grant și Tindall, 1986). Cele mai frecvente sînt cianobacteriile („algele" albastre-verzi) reprezentate, adesea, de culturi pure de *Spirulina* (13 000 filamente/$m^{-1}$) utilizată ca sursă de proteine și ca hrană aproape exclusivă de populațiile de flamingo. Se adaugă cianobacteria filamentoasă cu heterochiști, *Cyanospira* sp. (vechea denumire *Anabaenopsis)* și cianobacteriile unicelulare *Synechococcus* și *Chroococcus*.

Un alt grup de bacterii este reprezentat de *Ectothiorhodospira*, fototrof deosebit de activ în ciclul sulfului.

Grupul *Archaebacteria* este reprezentat de unele microorganisme unice în natură, în același timp halofile și alcalifile ca *Natronobacterium* sp. și *Natronococcus occultus*. Sînt microorganisme care conțin un pigment carotenoid roșu, ce colorează intens apa lacului. Se dezvoltă optim la pH 9,0—10,0 și la concentrații de 2,5—4,0 M NaCl.

Algele eucariote sînt reprezentate în special de diatomeele *Nitzschia* și *Navicula*.

Productivitatea primară a acestor lacuri este foarte ridicată: > 10 g C $m^{-2}/zi^{-1}$, în comparație cu cea a lacurilor cu apă dulce (0,6 g C $m^{-2}/zi^{-1}$) (Melack și Kilham, 1984). Ele reprezintă, probabil, cele mai productive medii acvatice naturale, datorită rezervelor nelimitate de $CO_2$ disponibil pentru creșterea autotrofă.

*Mediile alcaline bogate în* $Ca^{2+}$ corespund apelor subterane bogate în $Ca^{2+}$, foarte alcaline (pH 11,0). Sînt extrem de rare și legate de anumite localizări geologice (Oman, California, Cipru, Iordania, fosta Iugoslavie).

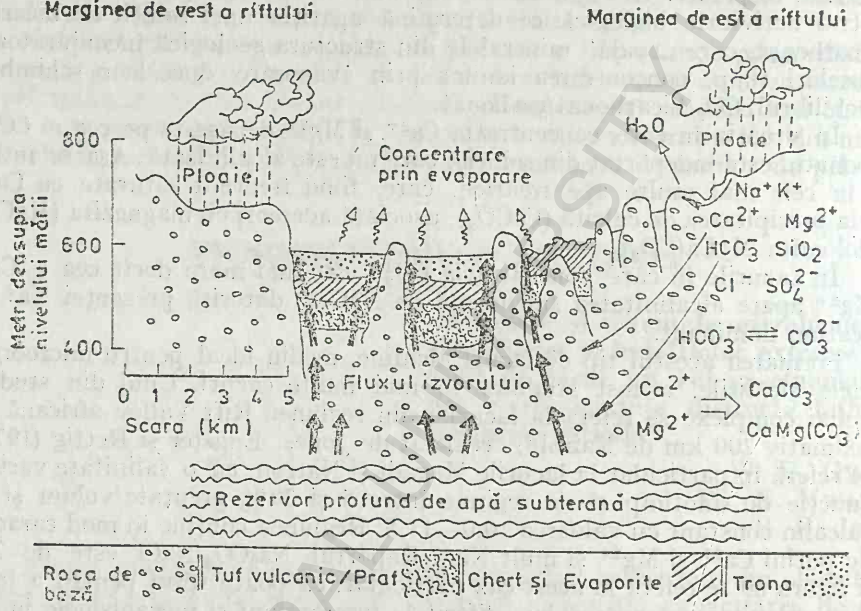



Fig. 69. — Reprezentarea schematică a mecanismelor posibil implicate în procesele desfășurate într-un lac sărat alcalin (după Grant, Mwatha și Jones, 1990).

Chimia lor este dominată de modificările fizice, chimice și biologice în structura și în compoziția solului, decurgînd în special din expunerea la acțiunea atmosferei (engl. „Weathering") și la temperaturi scăzute, a două minerale prezente în roca-gazdă: olivina ($MgFeSiO_4$) și piroxenul ($MgCaFeSiO_3$).

În zonele apropiate de suprafață, apele încărcate cu $CO_2$ acționează asupra acestor minerale, cu eliberare de $Ca^{2+}$ și $OH^-$, care trec în soluție. În aceste ape, cu pH 11,0, predomină în soluție $Ca(OH)_2$ (forma solidă în echilibru cu cea solubilă). Ionii $Na^+$ și $Cl^-$ sînt produși prin solubilizarea sărurilor din rocă, în timp ce $Mg^{2+}$ sînt îndepărtați ca serpentinită ($MgSi_2O_5(OH)_4$).

**Microorganismele prezente în apele bogate în** $Ca^{2+}$ sînt facultativ anaerobe și organotrofe. Numărul lor variază între $10^1$ și $10^4/ml^{-1}$. Cresc la pH 10,0.

Speciile cel mai frecvent întîlnite aparțin genurilor: *Actinobacillus, Bacillus, Caulobacter, Clostridium, Enterobacteriaceae, Flavibacterium, Hafnia,*

*Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*, prezente frecvent în sol și în ape cu condiții mai puțin extreme.

*Aplicații practice.* Microorganismele alcalifile sau alcalitolerante reprezintă o sursă bogată de proteinaze și amilaze active la pH alcalin, utilizabile în proporție de 0,4—0,6% în compoziția detergenților. Utilizarea lipazelor și a celulazelor este încă controversată. Prezența lor în asociere cu detergenții le mărește capacitatea de curățire, conferă o culoare strălucitoare albiturilor și împiedică depunerea de proteine pe suprafața acestora, care cu timpul le dă o tentă gri, aparent de obiect nespălat.

Sînt folosite, de asemenea, în industria de prelucrare a pieilor (tăbăcărie), făcînd procesul de sămăluire mai rapid, mai puțin poluant și asigurînd calități superioare. La pH alcalin se realizează îndepărtarea eficientă a proteinelor care leagă firele de păr în foliculi, fără a leza fibrele de colagen din piele și, în unele cazuri, fără a leza firele de păr, produs prețios.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# VIABILITATEA, SUPRAVIEȚUIREA ȘI LONGEVITATEA MICROORGANISMELOR

**„Microorganismele sînt adaptabile și au mijloace incredibil de complexe și de pline de ingeniozitate pentru supraviețuire, două proprietăți importante pentru condiția evoluției lor"**

K. F. BAKER

Microorganismele pot fi întîlnite virtual în orice mediu natural de pe Terra. Este evident că în unele dintre acestea pot fi expuse unor condiții de stress ca:

1) Lipsa sau cantitatea redusă de nutrienți întîlnită periodic nu numai în mediile acvatice, ci chiar în sol, mediu considerat, în general, ca bogat în nutrienți. Aceasta pentru că în sol, o mare parte din substanțele organice sînt deosebit de stabile. Unele dintre ele pot avea o vîrstă de 5—25 de ani, iar în cazul celor humice, derivate din produșii de degradare ai lignine-lor, ai celulozei sau ai metaboliților microorganismelor, chiar de 250—2 500 de ani (Gray, 1976).

2) Uscăciunea, respectiv lipsa apei necesare activităților metabolice. În general, bacteriile suferă mai mult din cauza uscăciunii decît fungii. Sînt, de regulă, inactive, cînd un sol argilos conține $< 12\%$ apă, iar, în unele cazuri, chiar la 23% apă.

3) Variații în concentrația $O_2$ în limite neadecvate tipului respirator al microorganismelor date.

4) Oscilații ale valorilor de pH dincolo de limitele fiziologice admise.

5) Prezența unor compuși toxici.

După Gray (1976), în prezența unor factori de stress pot intra în acțiune mai multe mecanisme, evidente, în special, în cazul microorganismelor din sol, menite să asigure viabilitatea și supraviețuirea lor. Între acestea sînt de menționat:

1) încetinirea ritmului de multiplicare și menținerea unei populații cu o rată mult mai diminuată de creștere:

2) starea de latență;

3) apariția de forme vegetative de rezistență capabile să supraviețuiască fără să crească.

## VIABILITATEA MICROORGANISMELOR

Raportat la microorganisme, în general, și la bacterii, în particular, termenul de *viabilitate* este definit cu ambiguitate, fapt reflectat de punctele de vedere a diferiți cercetători importanți.

Astfel, Valentine și Bradfield (1954) deosebesc bacteriile viabile (capabile să formeze colonii după multiplicare) de cele vii (care respiră, sînt mobile etc.). Definiția este confuză pentru că s-ar putea crede că bacteriile viabile nu sînt vii.

BCU IAȘI / CENTRALA UNIVERSITARĂ

Postgate (1969) definește viabilitatea drept proprietatea unei părți din populația de microorganisme capabile de multiplicare cînd i se asigură „condiții optime de creștere". Termenul „condiții optime" este criticabil deoarece aceste condiții nu sînt cunoscute pentru cele mai multe microorganisme din mediile naturale și pentru că ele variază foarte mult în raport cu populațiile individuale.

Kurath și Morita (1983), într-un demers mai pragmatic, consideră ca viabile microorganismele capabile să se reproducă pe medii agarizate adecvate exigențelor lor și ca neviabile pe cele care au pierdut această capacitate.

În sfîrșit, Roszak și Colwell (1987), plecînd de la observația că, raportat la celulele individuale, lucrurile se petrec după legea „totul sau nimic", definesc viabilitatea în raport cu procesul de diviziune, respectiv cu capacitatea de a forma cel puțin două celule-surori cînd o bacterie este depusă într-un mediu favorabil *.

Unele observații ecologice arată caracterul discutabil al acestor definiții și dificultatea utilizării lor, mai ales în cazul bacteriilor.

Utilizînd tehnici autoradiografice, Hoppe (1978) a demonstrat că microorganismele predominante în regiunile de coastă marine sînt reprezentate de bacterii care metabolizează activ, dar care nu formează colonii pe mediile uzuale cu agar. Prezența și cuantificarea lor nu se pot evidenția nici direct și nici prin numărarea coloniilor produse. El consideră că existența lor poate fi apreciată numai utilizînd tehnica numărului total de bacterii care metabolizează activ.

Un procent greu de apreciat dintre aceste bacterii corespund, după Postgate (1969, 1976), unei stări tranzitorii între viabilitate și moarte („bacterii muribunde"), care sînt încă funcționale, dar nu se mai pot multiplica.

Împreună cu Calcott, au demonstrat experimental că dintr-o populație a bacteriei *Klebsiella acrogenes* menținută înfometată, în soluție tampon nenutritiv, după 24 de ore, 20% din celule erau viabile (produceau prin multiplicare colonii), în timp ce aproximativ 80% erau intacte, răspundeau la modificări în compoziția și variațiile de concentrație ale substanțelor din mediu, sugerînd că sînt viabile, dar necultivabile. Postgate (1976) le consideră ca bacterii „pseudosenescente", deoarece au pierdut capacitatea de multiplicare ca rezultat al expunerii la o serie de stress-uri diferite, dar au rămas ca indivizi funcționale.

## SUPRAVIEȚUIREA MICROORGANISMELOR

După Morita (1980), supraviețuirea („Survival state") corespunde menținerii viabilității în circumstanțe adverse, în așa fel încît microorganismul supraviețuitor se poate manifesta prin reluarea activităților metabolice,

* Ambiguitatea este mărită și de faptul că, colocvial, se spune că o clonă sau o populație de microorganisme este mai viabilă decît alta, în sensul că este mai rezistentă la stress, mai activă metabolic sau capabilă de multiplicare mai rapidă sau mai extensivă.

a creșterii și multiplicării ori de cîte ori mediul redevine favorabil acestor procese, uneori chiar în condiții limită.

Pentru a supraviețui, microorganismele recurg la mai multe strategii:

1) pot deveni temporar inactive, necultivabile pe medii convenționale, dar viabile (fapt demonstrat prin capacitatea de a îngloba substrate radioactive, de a avea activități respiratorii reduse, de a se colora diferențial etc.;

2) utilizînd pentru o creștere extrem de lentă cantități minime de substrat;

3) trecînd într-o stare de latență.

### Factorii care favorizează supraviețuirea microorganismelor

Microorganismele prezente în mediile naturale au dezvoltat, în cursul evoluției, o serie de strategii, care prelungesc durata viabilității lor, chiar în condiții relativ nefavorabile. Unele dintre aceste strategii sînt în special evidente în cazul microorganismelor din sol.

### Tipul de creștere

Deși raportul suprafață/volum al hifelor fungice este mai puțin favorabil pentru creștere decît cel al unei cantități echivalente de microorganisme unicelulare, fungii sînt avantajați prin faptul că se extind pe suprafețe considerabile (uneori pînă la 5 m/g de sol). În aceste condiții, ei nu sînt pe toată lungimea hifelor în regiuni complet nefavorabile pentru creștere. Ca urmare, supraviețuirea poate fi asigurată prin creștere locală (în regiunea favorabilă nutrițional).

În același timp, viteza redusă de creștere este un factor favorizant pentru supraviețuire.

Un alt avantaj decurge din posibilitatea agregării hifelor pentru a forma filamente plurihifale sau rizomorfe complexe, adesea diferențiate. În acest caz, hifele externe exercită o funcție protectoare pentru cele interne.

În aceste condiții, dacă creșterea fungilor are ca punct de plecare o regiune bogată în nutrienți, hifele pot circula pe distanțe foarte mari, printr-un sol complet lipsit de orice substrat nutritiv, pînă cînd întîlnesc o nouă regiune favorabilă pentru creștere (Gray, 1976).

Garret (1956) a semnalat capacitatea fungilor patogeni, care atacă rădăcinile plantelor, de a crește saprofit („Competitive saprophytic ability"), în absența gazdei și de a trece rapid de la parazitism la un mod de viață saprofit, supraviețuind îndelungat prin colonizarea substanțelor neanimate. Ei realizează acest fenomen printr-un răspuns complex care implică:

1) răspunsul rapid al propagulelor fungice latente și creșterea rapidă după expunere la nutrienții solubili care difuzează din substrat;

2) elaborarea unei game largi de enzime capabile să atace, în special, resturile vegetale rezistente (celuloză, lignine etc.);

3) producerea de antibiotice și alți compuși, care afectează microorganismele din sol;

4) toleranța față de compușii nocivi elaborați de alte microorganisme din sol.

### Rolul radiațiilor naturale

Ideea că expunerea continuă la acțiunea radiațiilor naturale ar putea influența prin efectul său cumulativ supraviețuirea microorganismelor este relativ veche. S-a presupus, de la început, că efectul lor letal depinde de prezența sau de absența unor materiale protectoare.

Unele considerații teoretice și/sau experimentale infirmă acest punct de vedere.

Astfel, Gest și Mandelstam (1987) au testat numărul mutantelor auxotrofe prezente într-o populație de celule progene derivate din spori „proaspeți" de *Bacillus subtilis*, comparativ cu cele derivate din spori care au fost păstrați timp de 16 ani. Ei nu au găsit nici o diferență sub raportul frecvenței mutațiilor, ceea ce demonstrează că radiațiile naturale nu par să aibă efecte notabile în cursul perioadei respective.

Considerînd că sporii unei bacterii „sălbatice" (prototrofe, fără mutații auxotrofe) suferă mutații (rata mutațiilor de $10^7$/genă) determinate exclusiv de acțiunea radiațiilor naturale, Gest și Mandelstam (1987) apreciază că timpul de înjumătățire al unei populații de spori menținută în condiții de conservare ar fi de aproximativ 7000 de ani. Utilizînd această valoare și presupunînd o rată exponențială de moarte decurgînd din leziuni induse de radiațiile naturale, se consideră că o populație inițială de $10^{10}$ spori ar mai conține încă un număr măsurabil de spori viabili după minimum 200 000 de ani.

În sensul acesta pledează și datele lui Weber și Greenberg (1985), care consideră că în condiții ce simulează spațiul interstelar (temperatură joasă și vid foarte înalt), la care au asociat acțiunea fluxului de UV efectul nociv este atenuat în așa fel încît durata supraviețuirii sporilor de *Bacillus subtilis* poate fi apreciată ca fiind de ordinul milioanelor de ani.

### Stabilitatea macromoleculelor biologice

După cum remarcă Gest și Mandelstam (1987), durata maximă a criptobiozei este determinată de stabilitatea pe termen lung a macromoleculelor celulare și, în primul rînd, a proteinelor și a ADN. Ei citează cîteva date, care demonstrează o stabilitate neașteptat de mare, cel puțin în anumite condiții.

Astfel, Keilin (1959) a probat stabilitatea proteinelor de grup sanguin și menținerea reactivității lor serologice după 5000 de ani.

Mai recent, Lowenstein (1985) a detectat hemoglobina și unele resturi antigenice ale ei în oase vechi de 4500 de ani și prezența unor albumine și a colagenului în țesuturile unui mamut după ~ 40 mii de ani.

În sfîrșit, Paabo (1985) a demonstrat menținerea integrității biologice a moleculelor de ADN probată prin clonarea lor după recoltarea de la o mumie egipteană, veche de 2400 de ani.

Aceste date sugerează posibilitatea menținerii foarte îndelungate a unor macromolecule biologice esențiale mai ales în anumite condiții (în anaerobioză, uscăciune, protejate de învelișuri sporale groase etc.).

### Starea de latență a microorganismelor

Și termenul de latență este folosit cu un grad important de ambiguitate, deși este evident că în anumite medii naturale, pe lîngă microorganismele moarte, datorită condițiilor nefavorabile, un anumit procent suferă modificări metabolice importante care le permit să supraviețuiască acestor condiții, uneori, perioade îndelungate.

Microorganismele pot prezenta o stare de hipobioză în cursul căreia supraviețuiesc în absența nutrienților, prezentînd o rezistență mai mare la acțiunea agenților letali. Ea a fost indusă experimental prin expunerea la temperaturi scăzute, lipsă de $O_2$, deshidratare, expunere la concentrații mari de săruri sau combinații ale acestora și mai ales la condiții ce simulează particularitățile mediului marin abisal (Barrcss și colab., 1975).

Keilin (1959) a propus denumirea de „criptobioză" pentru a caracteriza starea unui organism care nu prezintă nici un semn vizibil de viață, a cărui activitate metabolică devine greu măsurabilă, datorită unei stări de latență reversibilă.

După Hawker (1959), starea de hipobioză poate fi de două tipuri:

1) *latența* („Rest state" sau „Dormancy"), în cursul căreia activitatea metabolică este foarte mult redusă, dar încă detectabilă și

2) *criptobioza*, stare similară morții, în cursul căreia activitatea metabolică este absentă sau nedetectabilă, deși organismele sînt departe de a fi moarte. Ea este întîlnită în cazul sporilor bacterieni și fungici.

Pentru Susmann și Halvorson (1966), latența reprezintă o întrerupere reversibilă a dezvoltării microorganismelor datorită diminuării activităților lor metabolice, ca o necesitate primordială pentru a asigura, spre exemplu, supraviețuirea la înfometare.

Starea de latență explică discrepanța, uneori extrem de mare, dintre numărul microorganismelor observate direct la microscop și numărul mic apreciat prin tehnicile de cultivare. Aceasta pentru că nu toate microorganismele latente reușesc să se adapteze la mediile bogate utilizate în laborator.

Ea explică de asemenea „absența" tranzitorie a unor organisme din apă sau sol, care pot fi evidențiate doar sezonier, ca și situația patogenilor din sol, care „dispar" și reapar după ce ajung în solul umed sau în apele naturale bogate în substanțe organice.

## ROLUL METABOLISMULUI ENDOGEN ÎN SUPRAVIEȚUIRE

Microorganismele pot supraviețui perioade îndelungate în absența nutrienților din mediu. Cu toate acestea, suspensiile apoase de bacterii aerobe și facultativ anaerobe „înfometate" prezintă coeficienți respiratori măsurabili. Aceasta demonstrează existența unor procese de oxidare a materialului celular propriu, necesare, probabil, pentru a asigura producerea de energie și resinteza, din surse de C și N endogene, a constituenților celulari esențiali, care pot suferi degradări în cursul înfometării.

Metabolismul endogen, studiat mai ales la bacterii, este definit de totalitatea reacțiilor metabolice care apar în celula vie în absența din mediu a compușilor sau a elementelor ce servesc, în mod normal, ca substraturi nutritive specifice exogene. Existența metabolismului endogen nu implică prezența obligatorie în celule a unor rezerve specializate de C, N și energie, deoarece

el se poate manifesta și în absența acestora, pe seama degradării materialelor celulare esențiale de tipul proteinelor sau al acizilor nucleici. Reacțiile caracteristice metabolismului endogen pot continua și în prezența unor substanțe nutritive în mediu, dacă acestea nu au pătruns încă intracelular.

Furano și Green (1963) consideră că deosebirea metabolismului exogen de cel endogen este, în mare măsură, de ordin semantic, în timp ce Dewes (1978) o consideră ca o realitate obiectivă cu următoarele funcții esențiale pentru supraviețuirea bacteriilor în condiții de înfometare: 1) asigurarea energiei necesare pentru activitatea metabolică și biologică, în general, la limita inferioară pentru asigurarea viabilității; 2) furnizarea surselor de C și N necesare pentru resinteza unor constituenți celulari esențiali degradați; 3) asigurarea nevoilor de P și S la organismele care stochează aceste elemente sub formă de polifosfat sau granule de sulf.

## Substraturile utilizate în metabolismul endogen

În general, metabolismul endogen se realizează pe seama compușilor de rezervă energetică (polizaharide, lipide, polifosfat, poli-β-hidroxibutirat etc.). În anumite condiții însă, sînt utilizați și aminoacizii liberi intracelular, precum și unele molecule esențiale supuse la turnover, cum sînt proteinele și moleculele de ARN.

*Rolul substanțelor de rezervă.* Cele mai multe microorganisme acumulează rezerve de C, P, energie etc., care sînt degradate în cursul înfometării pentru a furniza celulei substanțele necesare pentru resinteza compușilor esențiali degradați și energia necesară pentru menținerea viabilității.

Cînd celulele produc mai multe tipuri de substanțe de rezervă, condițiile de mediu și mecanismele proprii de reglare determină proporția diferiților compuși care sînt stocați. Ca regulă generală, în cursul înfometării, rezervele sînt consumate treptat. Celulele care conțin cantități mai mari de substanțe de rezervă au o supraviețuire mai îndelungată deoarece sînt mai rezistente la condițiile care duc la autoliză și moarte.

*Rolul moleculelor esențiale în metabolismul endogen al bacteriilor.* În mod particular, acest proces afectează proteinele și acizii nucleici. În cursul înfometării, proteoliza este mai generalizată și mai uniformă, dar nu în mod obligatoriu mai intensă decît în faza de creștere, deoarece în celulele care cresc are loc o rezinteză continuă a proteinelor degradate. Cu toate acestea, unii cercetători au semnalat la *Escherichia coli* o creștere de ~ 6 ori a vitezei de degradare a proteinelor, indiferent de natura nutrienților absenți (aminoacizi, sursă de energie etc.).

Hwang și Goldberg (1988) au evidențiat în extractele de *E. coli* prezența a nouă activități endoproteolitice distincte, notate *Do*, *Re*, *Mi*, *Fa*, *Sol*, *La*, *Si*, *Pi* și *Ti*, capabile să asigure degradarea proteinelor. Nu se știe care dintre ele este în special activă în metabolismul endogen și nici dacă sînt sintetizate *de novo* sau sînt preexistente în celule și activate de proteinele anormale prezente în celulele expuse la stress. Aminoacizii rezultați sînt folosiți pentru sinteza de proteine noi care asigură supraviețuirea și eventual creșterea foarte limitată.

De asemenea, s-a demonstrat că *E. coli* pierde în primele 4 ore de înfometare 20—30% din ARN celular, după care ritmul degradării scade la 10% în următoarele 20 de ore. Degradarea afectează, inițial, polisomii, care

sînt scindați la monosomi. Ulterior are loc disocierea subunităților ribosomale 30S și 50S, sub acțiunea RNazei I, și, final, eliberarea proteinelor și a nucleotidelor. Proteinele sînt parțial degradate și parțial legate de membrana celulară, în timp ce nucleotidele sînt folosite ca nutrienți și ca material pentru sinteza de ARNm. În ansamblu, procesul este coordonat de ribonucleazele I și II, și de polinucleotid-fosforilaza.

Un rol esențial în viabilitate și supraviețuire au $Mg^{2+}$, esențiali pentru stabilizarea ribosomilor, prin rolul jucat în activitatea enzimelor și prin efectul stabilizator asupra unor mecanisme de reglare.

### Energia de supraviețuire și menținere

Dawes (1978) a definit conceptul de *energie de menținere* ca fiind reprezentat de consumul minim de energie necesar pentru alte scopuri decît pentru producerea de material celular, respectiv pentru asigurarea unor procese biochimice și eventual mecanice (reglare osmotică, menținerea pH intracelular, turnover de macromolecule esențiale, mobilitate minimă etc.), precum și pentru menținerea unei concentrații-limită de constituenți celulari. Energia de menținere reprezintă, deci, cantitatea de energie-prag necesară pentru a asigura menținerea bacteriilor în stare viabilă în cursul înfometării. Ea poate fi asigurată, după cele mai multe estimări, în anumite limite de timp, în exclusivitate de metabolismul endogen.

Astfel, nevoile energetice de menținere studiate la *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *K. cloacae*, în cursul metabolismului aerob, exprimate prin cantitatea de glucoză consumată, reprezintă 0,076—0,094 g glucoză/$g^{-1}$. greutate uscată/oră$^{-1}$.

În anaerobioză, nevoile sînt mai mari: 0,473 g glucoză/$g^{-1}$ greutate uscată/oră$^{-1}$ reflectînd producerea mai scăzută de energie de la glucoză în aceste condiții.

### Relațiile dintre condițiile de mediu și metabolismul endogen

Degradarea lentă a substanțelor de rezervă, ca și a moleculelor celulare asigură producerea de ATP la nivelul unor concentrații minimale compatibile cu exigențele de menținere ale celulei. Ca urmare, durata perioadei de supraviețuire în cursul înfometării este mult mai prelungită, comparativ cu bacteriile ce prezintă un metabolism endogen intens și rapid asociat cu risipă de energie și ducînd în scurt timp la moarte.

Evoluția a selectat, după cum probează numeroase fapte de observație, bacterii cu particularități de metabolism endogen corelate cu condițiile întîlnite în mediul lor natural. Astfel, bacteriile din sol au un metabolism endogen lent, care le asigură supraviețuirea într-un mediu caracterizat printr-o concentrație mai scăzută de nutrienți și printr-un ritm foarte rar și incert de alternanță cu aportul unei cantități importante de nutrienți. În schimb, bacteriile din gură și intestin, care trăiesc în mod normal în medii în care alternanța dintre abundența de nutrienți și relația înfometare se succede rapid și la intervale scurte de timp, au, comparativ, un metabolism endogen mult mai rapid.

### Adaptări celulare pentru supraviețuire la înfometare

Roszak și Colwell (1987) consideră, pe baza a numeroase date din literatură, că înfometarea bacteriilor determină o scădere a mărimii și activității lor, care revin la normal cînd starea de stress încetează. Astfel, unele specii de bacterii autohtone marine expuse la înfometarea cu C și N suferă o diviziune „reductivă", cu apariția unor populații de celule cu dimensiuni mici și cu un raport suprafață/volum mărit.

Carlucci (1974) a demonstrat că bacteriile cu cea mai mare longevitate sînt mici, în comparație cu cele cultivate în laborator, și au o activitate metabolică mult mai redusă. De aceea, el consideră că prezența unor celule mici rotunde în largul oceanului, unde concentrația C sub formă de substanțe organice dizolvate este foarte mică (μg/l), este semnul unei stări morfologice și fiziologice „normale" pentru condițiile definitorii ale mediului natural respectiv.

Modificările morfologice apărute cînd celulele bacteriene se rotunjesc, în condițiile citate, sînt asociate cu o scădere de volum de 15—300 de ori și ar corespunde unui răspuns fiziologic tipic pentru bacteriile puse în condiții de lipsă de nutrienți organici. Ele ar reprezenta, după Roszak și Colwell (1987), în cazul bacteriilor asporogene, stadii de latență similare sporilor sau de celule „adormite" („Somnicell").

**Ultramicrobacteriile.** Sub această denumire, Torella și Morita (1981) au descris o formă particulară de celule bacteriene, caracterizată prin dimensiuni foarte mici (Ø<0,3 μm), creștere lentă și incapacitate de a-și mări dimensiunile după inoculare pe medii cu agar bogate în nutrienți.

Au fost evidențiate în sol sub forma unor particule mici cu Ø de 0,08 μm, invizibile la microscopul fotonic, prezentînd pe microelectronografii diferențe structurale fine față de bacteriile normale corespunzătoare. Existența lor a fost demonstrată și în apa de mare, sub forma unor celule care traversează filtrele cu pori de 0,45 μm, dar care sînt reținute de cele cu Ø de 0,22 μm.

Ultramicrobacteriile evidențiate pînă în prezent aparțin genurilor *Spirillum*, *Mucothrix*, *Flavobacterium*, *Vibrio* și *Cytophaga*.

Izolarea lor din mediile naturale este condiționată de însămînțarea pe medii cu concentrații minime de nutrienți, după o incubație prelungită. Mediile uzuale de laborator sînt neadecvate, datorită bogăției mari de nutrienți care determină o moarte accelerată.

Apariția ultramicrobacteriilor a fost indusă și experimental *in vitro*, prin expunerea unor bacterii marine psihrofile la condiții prelungite de limitare de nutrienți.

Datorită dificultăților de a le obține în cantități mari, ultramicrobacteriile sînt greu de caracterizat biochimic și relativ puțin studiate.

După Roszak și Colwell (1987), ultramicrobacteriile ar reprezenta constituenți normali ai comunităților de bacterii autohtone din mediile marine și estuarine.

Nedetectarea lor cu tehnicile-standard de cultivare a bacteriilor reprezintă un factor de eroare semnificativ în aprecierea numărului real de microorganisme din anumite medii.

Prezența ultramicrobacteriilor în mediile sărace în nutrienți ar reprezenta o strategie primordială în evoluția mecanismelor de supraviețuire a bacteriilor în natură.

## Celulele „precursor de creștere"

**„Conceptul de celulă precursor de creștere se aplică, probabil, unui spectru larg de specii bacteriene, ca parte a oricărui ciclu celular bacterian, acționînd nu numai ca o celulă de supraviețuire, ci și ca o platformă de la care se poate declanșa diferențierea la unul dintr-o varietate de tipuri celulare posibile, în funcție de stimuli încă necunoscuți din mediu".**

C. S. Dow
R. Whittenbury
N. G. Carr

Sub denumirea de celule „precursor de creștere" („Growth precursor" sau „Shut down cells" — engl. Shut-down = a înceta să lucrezi), Dow și Whittenbury (1980, 1983) au propus un concept nou pentru a caracteriza modalitatea de supraviețuire a anumitor specii bacteriene în medii ostile pentru creștere. Ei se bazează pe observația că unele specii bacteriene produc, după diviziune, unele celule care diferă de cele parentale prin incapacitatea de a iniția imediat un nou ciclu celular, chiar cu riscul de a muri într-un mediu ostil. Datorită unei stări fiziologice speciale, celulele „precursor de creștere" pot iniția un nou ciclu de creștere și reproducere numai în urma unui semnal din mediu.

Prezența lor ar fi caracteristică mediilor acvatice, în care perioadele cu condiții favorabile de creștere pot alterna cu perioade foarte lungi fără nutrienți și fără alte condiții esențiale.

Acest mod de comportare este tipic pentru bacteriile cu cicluri morfogenetice complexe ca: *Rhodomicrobium vannielii*, *Hyphomicrobium*, *Caulobacter crescentus* etc. În afară de bacteriile prostecate și de cele care „înmuguresc", formarea celulelor „precursor de creștere" a mai fost descrisă la: *Bdellovibrio* sp., *Sphaerotilus*, *Nitrobacter*, precum și la unele cianobacterii (*Anabaena catenula*, *Nostoc muscorum*, *Chlorogloeopsis* etc.). El corespunde unui tip de metabolism limitat, lipsit de biosinteze, care asigură doar supraviețuirea celulei, ideal adaptată pentru a-și prelungi viața în medii nefavorabile, letale pentru celulele care cresc și se multiplică în mod normal.

Dow, Whittenbury și Carr (1983) ilustrează conceptul de „celulă precursor de creștere" cu bacteria fototrofă *Rhodomicrobium vannielii*, prezentă în natură, în special, sub formă de complexe multicelulare. Ea formează, în funcție de condițiile de mediu, trei tipuri distincte de celule:

1) *celule ovoide*, reunite de filamente celulare fine, ramificate, alcătuind grupuri caracteristice;

2) *celule „roitoare"* („Swarmer cells"), mobile, flagelate, peritriche, care sînt formate la extremitățile filamentelor;

3) *spori colțuroși* formați, de asemenea, la extremitățile filamentului. Exosporii apar cînd nutrienții din mediu sînt epuizați. Ei au proprietăți de rezistență asemănătoare endosporilor de la *Bacillus* sp. În condiții de mediu favorabile, ei germinează, producînd, de regulă, patru celule vegetative (fig. 70).

În plus, *R. vannielii* are, tot în funcție de condițiile de mediu, două cicluri de celule vegetative, care diferă prin tipul de celulă format și prin modul de separare a celulelor progene:

Primul ciclu duce la formarea de complexe multicelulare caracteristice, în care separarea celulelor se face prin formarea unui „dop" în interiorul unui filament, separînd două celule învecinate. Ciclul de diferențiere, urmat de formarea de lanțuri ramificate de celule evoluează cînd mediul este puternic iluminat, iar concentrația $CO_2$ este redusă.

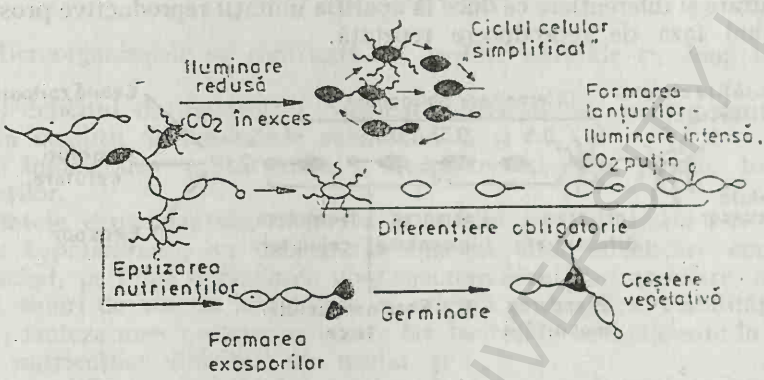



Fig. 70. — Modificări celulare la *Rhodomicrobium vannielii* corelate cu prezența unor stimuli specifici din mediu. Iluminarea slabă și concentrația mare de $CO_2$ determină formarea de celule „roitoare", în timp ce iluminarea intensă și concentrația mică de $CO_2$ determină formarea de lanțuri celulare. Epuizarea nutrienților determină formarea de exospori rezistenți, care pot germina în condiții favorabile pentru a forma patru celule vegetative (după Dow, Whittenbury și Dow, 1983).

Cel de-al doilea ciclu „simplificat" este realizat prin apariția unui „mugure" reproductiv, care eliberează, prin diviziune simplă, celule „roitoare". Apariția celulelor „roitoare" este condiționată de o iluminare slabă și de un mediu bogat în $CO_2$. Izolate și cultivate în condiții de fototrofie, ele se dezvoltă parcurgînd o serie de etape obligatorii de diferențiere, bine definite morfologic, la capătul cărora, în funcție de condițiile de mediu, se pot forma, după caz, lanțuri de celule, celule roitoare sau exospori (fig. 71).

Pe baza cercetărilor experimentale efectuate pe trei specii bacteriene neînrudite, *R. vannielii*, *Caulobacter crescentus* și *Hyphomicrobium*, Dow, Whittenbury și Carr (1983) ajung la concluzia că tipul de celulă „roitoare" reprezintă din punct de vedere biologic o entitate comună celor trei specii, avînd caracterul de celulă „precursor de creștere", cu următoarele particularități:

1) este o celulă mobilă, o perioadă de timp, necorelată cu alte evenimente ale ciclului celular, care sînt definite ca moment de inițiere și ca durată;

2) conține cel puțin zece tipuri de proteine noi neîntîlnite în formele reproductive;

3) are o activitate metabolică endogenă foarte redusă în comparație cu celelalte etape ale ciclului celular;

4) nu face sinteză de ADN și ARNr;

5) conține un nucleoid în formă înalt condensată, deci cu un coeficient ridicat de sedimentare;

6) are capacitatea de a monitoriza mediul în care a apărut și, în funcție de proprietățile acestuia, în condiții favorabile își poate, menține această stare, întîrziind ciclul de diferențiere. Realizează acest fenomen cu ajutorul unor „receptori pentru mediu" care, sesizînd anumiți factori-cheie sau substanțe încă neidentificate, fie blochează ciclul de diferențiere, fie amorsează faza de maturare și diferențiere ce duce la apariția unității reproductive prostecate, declanșînd faza de reproducere repetată.

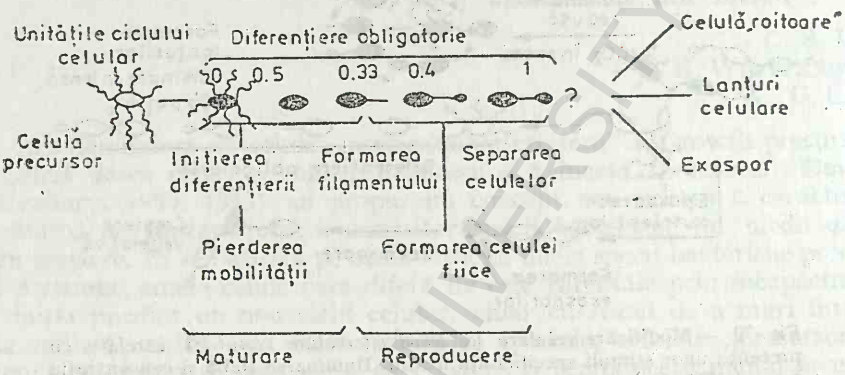



Fig. 71. — Reprezentarea schematică a ciclului celulelor „roitoare" la *Rhodomicrobium vannielii* (după Dow, Whittenbury și Carr, 1983).

Conceptul de celulă „precursor de creștere" („Shut down cell") este, probabil, aplicabil unui spectru larg de bacterii. El definește, în esență, o formă de supraviețuire în condiții critice de mediu, capabilă însă să fie punctul de plecare al unui ciclu de diferențiere, în funcție de stimuli neindentificați din mediu.

## „Efectul populațional"

Harrison (1960) a studiat particularitățile supraviețuirii populațiilor de bacterii cu densități diferite. El a constatat că populațiile mai sărace mor mai repede decît cele mai dense. Procesul însă nu este simplu. El nu este consecința faptului că populațiile mai sărace conțin mai puține bacterii și, în consecință, întreaga populație moare mai repede. Din contră, s-a demonstrat că, în anumite limite, rata specifică de moarte a populațiilor dense este mai mică decît cea a celor sărace.

Mecanismele acestui „efect populațional" sînt necunoscute. Pentru explicarea lui au fost emise două ipoteze:

1) Creșterea criptică sau canibalismul („Turnover cell" sau „Regrowth") rezultat al faptului că multe dintre substanțele eliberate de microorganismele moarte sînt metabolizabile și folosite de bacteriile vii, le prelungesc viabilitatea și, în anumite limite, chiar le asigură o multiplicare lentă. Postgate și Hunter (1962, 1976) au calculat că moartea prin înfometare a 50 de celule

de *Klebsiella aerogenes* asigură substanțele nutritive necesare pentru dublarea unui supraviețuitor într-o soluție-tampon lipsită de alți nutrienți.

2) Substanțele toxice eliberate de microorganismele expuse la stress sînt mai ușor tolerate sau chiar îndepărtate de populațiile bacteriene ce depășesc anumite concentrații-prag.

## MECANISME GENETICE ASOCIATE CU SUPRAVIEȚUIREA LA ÎNFOMETARE

Microorganismele se confruntă în mediile naturale cu două situații-limită:

1) deficitul de nutrienți („Nutrient limitation")*, care permit creșterea în condiții de dezvoltare submaximală și

2) înfometarea („Starvation"), respectiv absența practic totală a nutrienților.

Datele experimentale, obținute în special pe *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium*, au demonstrat apariția unor modificări complexe, care includ, pe lîngă degradarea unor macromolecule intracelulare, apariția a două tipuri de reacții adaptative ce asigură prelungirea viabilității lor:

1) sinteza unor proteine noi, care fac bacteriile mai eficiente în prelucrarea nutrienților deficitari din mediu, și

2) modificarea fenotipului celular, la forme mult mai rezistente la stress (Matin și colab., 1989).

### Sinteza de proteine noi

În unele cazuri, răspunsul față de deficitul de nutrienți este mai complex și include mărirea concentrației enzimelor implicate în preluarea nutrientului limitant din mediu, sinteza unor proteine alternative cu o mai mare afinitate pentru el sau dobîndirea unor proprietăți noi (obținerea nutrientului deficitar sau absent dintr-o serie de substrate alternative). Iată cîteva exemple, citate de Matin (1989):

*Deficitul de N.* Cînd concentrația $NH_4^+$ în mediu este $> 1$ mM, bacteriile enterice asimilează N prin aminarea reductivă a α-cetoglutaratului la glutamat, prin activitatea glutamat dehidrogenazei. La concentrații inferioare, celula bacteriană reacționează mărind numărul genelor și al operonilor activi în asimilarea N. Aceste gene și operoni constituie sistemul *Ntr* a cărui exprimare implică intervenția unor promotori multipli, a factorului δ, precum și participarea unei serii complexe de fosforilări și uridilări, a unui component sensor și a unui reglator (fig. 72).

Produsul lor este glutaminsintetaza, care are o mai mare afinitate pentru $NH_4^+$. Formarea acestei enzime este represată în medii cu o concentrație mare de $NH_4^+$ sau N organic (1% extract de levuri + 1% peptonă). Cînd este indusă însă, ea poate să ajungă la concentrația de 1% din greutatea proteinei celulare.

*Deficitul de P.* În mod asemănător, scăderea concentrației fosfatului anorganic ($P_i$) în mediu, sub 1 mM, induce la *E. coli* o serie de mecanisme menite să suplinească acest deficit. Unul dintre cele mai importante este

* Termenul „Nutrient deprivation" (lipsa nutrienților), folosit relativ frecvent în literatura de limbă engleză, desemnează ambele situații.

sistemul *Pst* („P system transport"), cu mare afinitate de transport al $P_i$, care suplimentează mecanismul normal constitutiv, cu afinitate slabă (sistemul *Pit* de transport al fosfatului anorganic). Primul sistem este dirijat de ATP, celălalt (Pit) de energia protonmotrice.

În același timp, lipsa fosfatului induce și alte mecanisme asociate ca:

1) apariția sistemului de transport PrPhoE, reprezentat de o porină, care facilitează transportul în celulă al fosfaților cu moleculă mare;

2) activarea genelor *psiB* și *psiC* și respectiv a sistemului de transport al glicerol fosfatului;

3) sinteza fosfatazei alcaline BAP, produs al genei *pho A*;

4) sinteza liazei codificată de gena *psiD* (fig. 72).

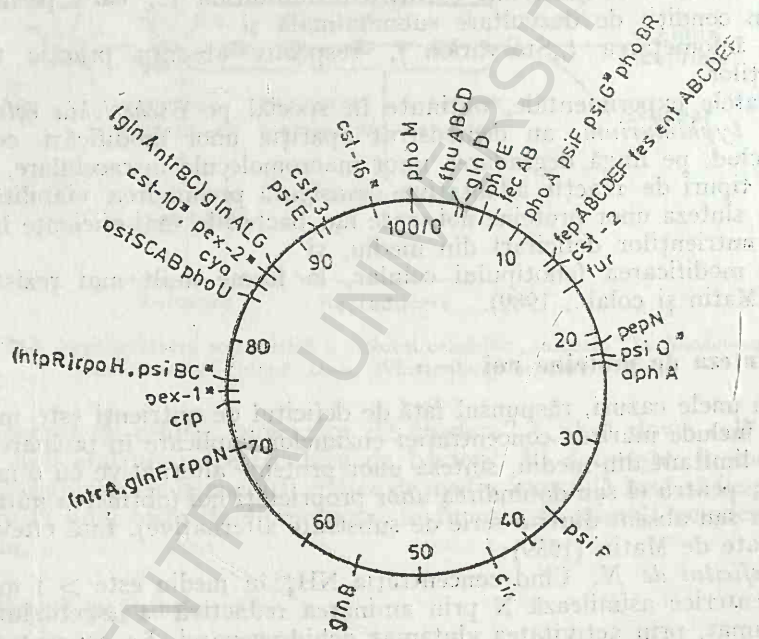



Fig. 72. — Harta genetică cromosomală a bacteriei *Escherichia coli* $K_{12}$, evidențiind localizarea genelor implicate în răspunsul la infometare. Genele a căror poziție este incertă sînt marcate cu un asterisc (după Matin, 1989).

*Deficitul de Fe**. Bacteriile au dezvoltat, de-a lungul evoluției, mai multe sisteme de înglobare a Fe. La concentrații mai mici de 1 μM, ele se aprovizionează cu Fe sintetizînd chelatori (siderofori), cu mare afinitate pentru Fe.

Cel mai simplu sistem studiat din punct de vedere genetic este cel al grupului de gene pentru aerobactină, situate într-un operon unic de 8 kbp, situat pe plasmide $IncF_1$. Reglarea lui este efectuată de o genă cromosomală *fur* („ferric uptake regulation").

* Vezi capitolul Patogenitate și virulență.

*Deficitul de C.* Efectele sale au fost studiate experimental în chemostat, utilizînd medii cu C ca nutrient limitant, și în experiențe cu bacterii marine.

Răspunsul dominant este reprezentat de creșterea capacității de preluare a C din mediu, în special pe două căi: 1) prin creșterea concentrației enzimelor care preiau acest substrat și 2) prin inducția unor sisteme de transport cu mare afinitate pentru compușii carbonului. Bazele genetice și moleculare ale acestui efect sînt necunoscute.

Un rol important în reglarea utilizării C la bacterii au cAMP și proteina CAP. În acest sens este de menționat că Botsford și Drexler (1978) au demonstrat creșterea marcată a cAMP în celulele bacteriene înfometate cu C.

**Rezistența la înfometare.** Recent s-a demonstrat că, pe lîngă creșterea capacității de înglobare a nutrienților din mediu, celulele sălbatice de *E. coli* dobîndesc, printr-un mecanism încă ignorat, ca răspuns la înfometare, o stare de rezistență mărită, similară sporilor.

În schimb, mutantele deficitare în peptidaze, supraviețuiesc cu greutate înfometării cu C și N. Spre deosebire de celulele sălbatice, aceste mutante nu își pot amplifica procesul de degradare a proteinelor la începutul înfometării și, în consecință, capacitatea lor de a sintetiza proteine în cursul înfometării este profund alterată din lipsa de aminoacizi.

Se știe, de asemenea, foarte puțin despre funcția proteinelor de înfometare („Starvation proteins"). Ele au, probabil, un rol important deoarece, pe de o parte, sînt sintetizate și în cursul altor stări de stress (șoc termic, șoc cu etanol), iar, pe de alta, sînt păstrate în cursul evoluției.

După Matin și colab. (1989), în cursul înfometării bacteriilor, între sensori și reglatori ar interveni o serie de semnale asemănătoare celor hormonale de la eucariote.

## LONGEVITATEA SPORILOR

**„Viabilitatea sporilor pare să fie mult mai mare decît se presupune în mod obișnuit ..."**

H. Gest
I. Mandelstam

Cele mai multe date referitoare la durata viabilității sporilor bacterieni și fungici sînt relativ vechi și destul de contradictorii.

În condiții controlate de laborator, durata maximă înregistrată este diferită în funcție de natura microorganismelor și de condițiile de mediu (tabelul nr. 14). Ea este de 47 de ani pentru *Bacillus anthracis* și de 75 de ani la *Hemitrichia clavata*. Sneath (1962) citează cazul unor spori de bacili termofili conservați timp de 118 ani în conserve. Date mai vechi, care menționau izolarea de spori viabili în roci sau în depozite de cărbuni din precambrian, sînt, în prezent, considerate ca bazate pe tehnici greșite (Gest și Mandelstam, 1987).

*Tabelul nr. 14*

**Longevitatea unor spori și forme vegetative și condițiile în care pot supraviețui** (după Sussman, 1965)

| Organismul | Stadiul | Longevitatea | Condiții de păstrare |
|---|---|---|---|
| BACTERII | | | |
| *Bacillus anthracis* | Spori | 47 ani | Flacoane închise și eprubete |
| *Clostridium sporogenes* | Spori | 46 ani | În alcool |
| *Salmonella thyphi* | Celule vegetative | 28 luni | În înghețată (—20°C) |
| *Rhizobium melilcti* | Celule vegetative | 30—45 ani | Sol autoclavat |
| 65 tulpini de bacterii nesporulate, diferite | Celule vegetative | 28 luni | La temperatura camerei, în întuneric |
| FUNGI | | | |
| *Hemitrichia clavata* | Spori | 75 ani | Colecție și herbar |
| *Lycogala flavofuscum* | Spori | 68 ani | Colecție și herbar |
| *Peronospora schleideni* | Oospori | 3—4 ani | Stare uscată |
| *Puccinia triticina* | Uredospori | 44 zile | —8°C pe plante |
| *Tilletia foetida* | Basidiospori | 25 ani | Herbar |
| *Ustilago nuda* | Miceliu | 11 ani | În semințe de orz |
| *Schizophyllum commune* | Corpi fructiferi și spori | 35 ani | —190° (3 săptămîni) |
| *Verticillium albo-atrum* | Microscleroți | 13 ani | În cultură sau în cîmp |

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Între datele considerate ca valabile privind longevitatea sporilor în condiții naturale citãm:

1) prezența sporilor de *Bacillus* sp., în particule de sol aderente de rădăcinile plantelor herborizate cu 320 de ani înainte, în Herbarul grădinii botanice regale din Londra;

2) evidențierea, cu ajutorul izotopilor radioactivi, a cîtorva spori viabili la tona de sol uscat, după 1000 de ani de la depozitare;

3) prezența sporilor viabili de *Thermoactinomyces* în șantierele arheologice romane din ținutul Northumberland (Marea Britanie), după 1900—2700 ani (au fost găsiți $\sim 10^4$ spori/g greutate uscată de reziduuri depuse în urmă cu 1900 de ani). Prezervarea a fost favorizată de menținerea lor inclavați în straturile de argilă care au creat, pe lîngă condițiile fizico-chimice adecvate, și anaerobioză.

4) Spori bacterieni viabili au fost evidențiați și în sedimentele unor lacuri a căror cronologie a putut fi determinată și apreciată la peste 2000 de ani.

În sfîrșit, utilizînd $^{14}C$ și apreciind ritmul de depunere anuală a straturilor de sedimente în lacul ELK din Minnesota, Parduhn și Waterson (1985) au evidențiat prezența sporilor de *Thermoactinomyces* în sedimente cu vechimea de 4392, 5144 și respectiv 7173 de ani.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# CUANTIFICAREA PREZENȚEI ȘI ACTIVITĂȚII MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ

„Dimensiunile extrem de mici ale bacteriilor și dimensiunile microscopice corespunzătoare ale habitatelor lor reprezintă problema tehnică majoră în ecologia bacteriană: cum să faci investigații ecologice reproductibile, cantitative și pertinente, asupra unor organisme invizibile".

J. S. POINDEXTER
E. R. LEADBETTER

„În ultimii ani, cercetările experimentale în domeniul ecologiei microorganismelor au revenit la principiile fundamentale ale biochimiei, fiziologiei și biologiei celulare"

D. M. KARL

„Eprubetele nu pot furniza un model pentru habitatul natural al microorganismelor pentru că este imposibil să simulezi pletora de interacțiuni care acționează în natură"

F. VAN BERKEEM
B. B. BOHLOOL

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# CUANTIFICAREA PREZENȚEI ȘI ACTIVITĂȚII MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ

**„Aplicarea unor metode analitice sensibile pentru studiul comunităților naturale de microorganisme este de-abia la început. Pe măsură ce metodele se vor îmbunătăți, ca sensibilitate și selectivitate, va deveni posibilă o privire mai profundă în lumea complexă a microorganismelor care dirijează ciclurile biogeochimice ale planetei"**

D. C. WHITE

Înțelegerea structurii și a funcției ecosistemului, obiectul primordial, esențial, pentru înțelegerea schimbului de materie și de energie *între* și *în cadrul* diferitelor sale compartimente vii sau nevii implică, cu necesitate, cunoașterea și cuantificarea cît mai aproape de realitate a unor parametri ecologici cu importanță fundamentală.

Inițial, studiile de ecologia microorganismelor din sol și din mediile acvatice au recurs la metodele de laborator utilizate în microbiologia clasică (examenul direct, determinarea numărului global sau a diferitelor grupuri fiziologice, studiul microorganismelor izolate pe medii de cultură etc.). Ulterior, s-a demonstrat că aceste date nu sînt relevante pentru realitățile din mediile naturale. Fără a renunța la acest tip de determinări, s-a demonstrat, fără echivoc, necesitatea de a lua în considerație două aspecte fundamentale pentru înțelegerea ecologiei asociațiilor de microorganisme în natură și anume: 1) aprecierea cantitativă a biomasei, care formează baza lanțurilor trofice și 2) activitatea metabolică și potențialul de creștere și multiplicare, care, pe plan global, reprezintă forța motrice a ciclurilor biogeochimice.

Cîteva probleme specifice complică studiul comunităților de microorganisme în mediile naturale și fac ca metodele de cercetare ale ecologiei microorganismelor să fie dintre cele mai puțin precise în cadrul științelor microbiologice:

1) Microorganismele trăiesc în microhabitate, cu dimensiuni micrmetrice sau milimetrice, separate de zone lipsite de microorganisme, în condiții fizico-chimice (calitatea și cantitatea nutrienților, pH, presiune osmotică etc.) foarte diferite de macrohabitatul înconjurător;

2) Marea heterogenitate a mediilor naturale, care pot conține uneori cantități mari de materie organică dispersată sau particulată, ce împiedică aprecierile indirecte de biomasă pe baza cantității totale de C, N, proteine etc.;

3) Microorganismele sînt prezente frecvent atașate de diferite suprafețe sau sub formă de agregate sau microcolonii greu de dispersat;

4) Pe lîngă formele active sau de latență (spori, chiști etc.), microorganismele pot exista ca forme „stresate", a căror capacitate de multiplicare este adesea blocată;

5) În condiții naturale, viteza activităților fiziologice (viteza de producere a biomasei și a diviziunilor celulare etc.) este mai mică decît potențialul fiziologic demonstrat în laborator. De aceea, tehnicile de apreciere a activităților metabolice trebuie să fie suficient de sensibile pentru a putea detecta o serie de activități cunoscute *a priori* ca foarte scăzute;

6) Microorganismele apar frecvent în consorții (asocieri cu grad mare de heterogenitate ca activități fiziologice și natură), care includ bacterii, fungi, alge și protozoare, în care celulele vii sînt asociate cu celule moarte, materie organică neanimată (detritus ) etc.

**Recoltarea probelor.** Examinarea și analiza microorganismelor în ecosistemele naturale *in situ* se lovesc de dificultăți tehnice insurmontabile. În același timp, lipsa de cunoștințe suficiente privind creșterea lor în natură, constrîngerile și interacțiunile la care sînt expuse în spațiu și în timp fac imposibilă construcția de analogi de laborator capabili să modeleze sistemele naturale. Pentru moment, singura soluție rămîne „izolarea" unor părți din ecosistemele complexe și examinarea lor în condiții controlate de laborator.

Recoltarea probelor este considerată ca prima dificultate majoră în studiul comunităților naturale de microorganisme, pentru că înseamnă îndepărtarea lor din mediul natural. Alegerea probelor reprezentative trebuie să țină seama de variabilitatea temporală și spațială a distribuției microorganismelor în natură, să reflecte diversitatea lor și, pe cît posibil, densitatea în întregul ecosistem din care au fost preluate.

Recoltarea lor și, în mod particular, amestecul pentru rațiuni de semnificație statistică perturbă microheterogenitatea normală spațială prezentă originar în mediul respectiv și ignoră particularitățile asociate cu regiuni ca: un grăunte de sol, rizosfera, colonizarea unor particule organice sau minerale.

În cazul unor ecosisteme stratificate heterogene, cum sînt cele acvatice, recoltarea convențională a probelor de apă și reunirea lor au drept consecință nu numai amestecul diferitelor populații, ci și al organismelor aerobe și anaerobe, cu consecințe importante asupra acurateții estimării lor cantitative.

În general, se consideră că proba unică este prea mică în raport cu întregul ecosistem și nesemnificativă pentru aprecierea rolului microorganismelor.

Mărimea și numărul probelor recoltate reprezintă un alt factor important. Riscurile de eroare sînt minimalizate prin prelucrarea unor probe complexe obținute prin amestecul unor probe individuale.

În cele mai multe lucrări însă, datorită dificultăților tehnice, numărul de probe este, după Karl (1986), în majoritatea cazurilor „regretabil de mic", astfel încît extrapolarea rezultatelor la nivel de ecosistem este expusă unor erori prin supra- sau subestimare.

Datorită heterogenității ecosistemelor și particularităților microorganismelor (care cresc sub formă de agregate sau microcolonii și niciodată uniform sau aleatoriu), obținerea unor probe reproductibile este practic imposibilă. Cel puțin pentru unele medii, semnificația determinării are valoarea unui „instantaneu fotografic" al prezenței și densității microorganismelor în momentul examinării în spațiul analizat, foarte diferit de zonele imediat adiacente (Zarnea, 1963).

**Transportul probelor.** Datorită dificultăților tehnice, cele mai multe determinări trebuie efectuate în laboratoare specializate. Aceasta implică

transportul probelor, în condiții cît mai apropiate de cele naturale (temperatură, cantitatea și calitatea iluminării, încazul microorganismelor fotosintetizante etc.) și respectiv adaptate după caz (sol, apă, sedimente etc.).

Se consideră, în mod convențional, că aceste condiții, foarte rar respectate, nu afectează viteza metabolismului caracteristic *in situ*, numărul și proporția diferitelor populații, ceea ce este greu de verificat și, în același timp, greu de presupus.

Un exemplu tipic a fost evidențiat de ZoBell și Anderson (1936) sub denumirea de „efectul sticlei (flaconului)" („Bottle effect"), în cazul probelor de apă de mare. Menținerea lor în flacoane de sticlă mai mult de 24 de ore determină modificări drastice, imprevizibile și variabile în compoziția populațiilor și în viteza metabolismului lor. Modificările sînt variabile după specie, condiții de transport (temperatură, pH etc.) și, în unele cazuri, apar chiar după 1—3 ore. Fenomenul este determinat de concentrarea nutrienților prin absorbție pe suprafața internă a flaconului, pe care unele microorganisme se dezvoltă în exces, în timp ce altele pot să moară (Venrick, 1977). De aceea, durata transportului trebuie redusă la minimum.

În cazul probelor utilizate pentru dozarea fosfolipidelor, păstrarea la +4°C determină o scădere de 20% din concentrația *in situ*, iar transportul la —70°C o scădere de 40%.

**Prelucrarea probelor.** Trebuie să fie rapidă și în condiții care să împiedice multiplicarea sau moartea microorganismelor. Probele recoltate din mediile naturale sînt numai rar în densități adecvate pentru o analiză directă. Frecvent, ele trebuie fie diluate, fie concentrate prin filtrare sau centrifugare și omogenizate, fapt care, de asemenea, determină modificări față de situația din natură.

Analizele trebuie efectuate în condiții de sterilitate, mai ales cînd se urmăresc prezența sau absența unor grupuri specifice de microorganisme. În general însă, contaminările chimice sînt mai grave decît lipsa de sterilitate a diferitelor dispozitive.

Studiul ecologiei microorganismelor implică, în principal: 1) determinări ale numărului lor în mediile naturale, fie direct, fie prin tehnici de cultivare (pentru aprecierea celulelor viabile); 2) determinări de biomasă și 3) determinări de activitate metabolică, asociată eventual cu stabilirea potențialului de creștere și multiplicare (fig. 73).

## EXAMINAREA DIRECTĂ A BACTERIILOR ÎN MEDIILE NATURALE

Contrar așteptărilor, examinarea directă a bacteriilor în diferite medii naturale este foarte dificilă și nesemnificativă: modificările morfologice și fiziologice sînt atît de marcate încît nu pot fi descrise și analizate decît în corelație directă cu condițiile de mediu prevalente în timpul observației. Ele au fost descrise de unii cercetători ca aparținînd unui „ciclu de viață", deși, în realitate, sînt guvernate de factori de mediu și lipsite de o bază genetică. De altfel, biologia moleculară a demonstrat că bacteriile sînt într-o stare dinamică, avînd o mare capacitate de acomodare la modificările parametrilor mediului înconjurător, prin intermediul unei largi varietăți de adaptări genetice și fenotipice ca, de exemplu: modificarea adecvată a sintezei enzimelor pentru a îngloba un nutrient limitant pentru creștere, modularea vitezei de preluare a nutrienților aflați în exces, dirijarea căilor metabolice

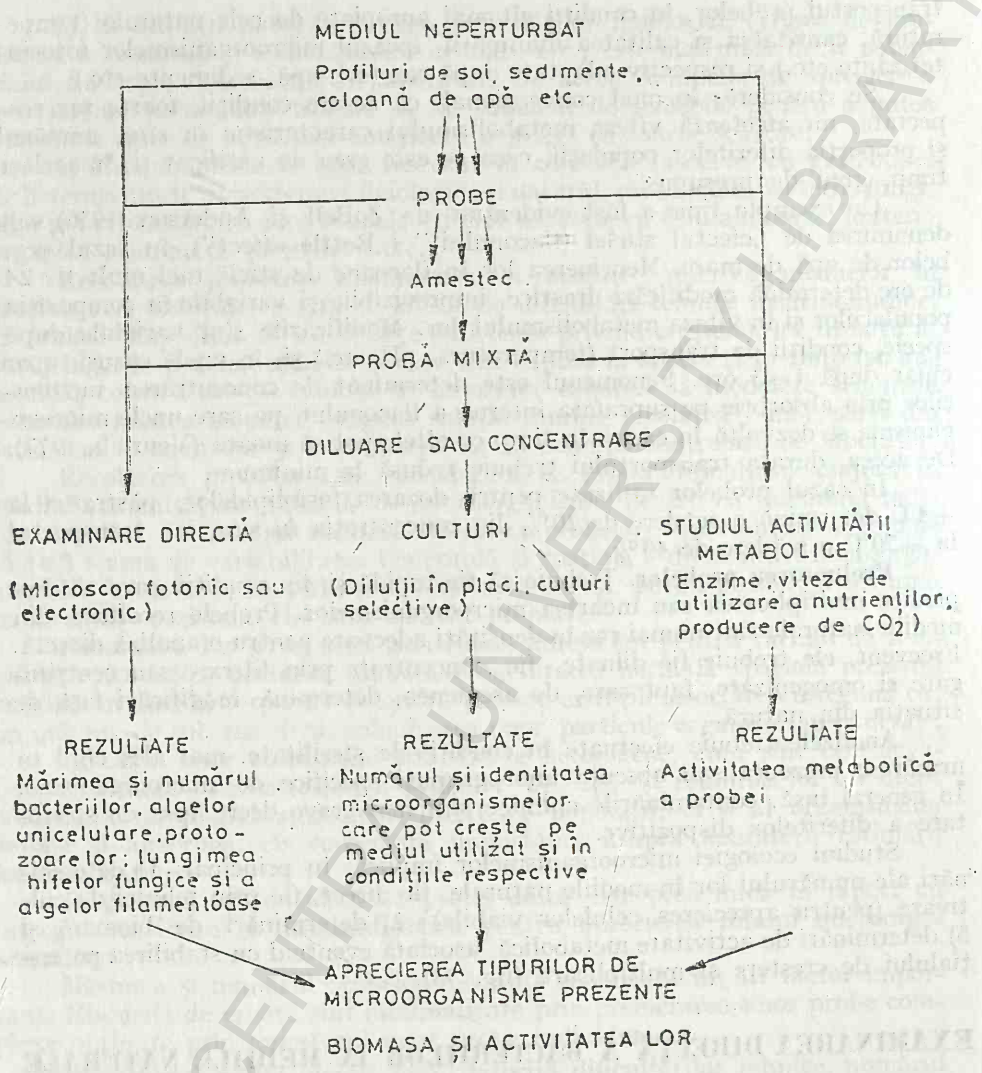



Fig. 73. — Reprezentarea sintetică a principalelor tehnici de studiu utilizabile în studiile de ecologia microorganismelor.

pentru a evita blocaje specifice datorită lipsei anumitor nutrienți esențiali, coordonarea vitezei sintezelor pentru a menține o creștere adecvată etc. Această mare capacitate adaptativă explică ușurința cu care microorganismele cresc în laborator în condiții adesea radical diferite de habitatul lor natural.

Fenomenele au fost reproduse și în condiții de laborator obținîndu-se celule mici, rotunjite („Nutrient stressed"), prin cultivare în medii sărace în nutrienți. Caracteristice mediilor naturale oligotrofe, aceste celule „pitice" („Dwarfs") sînt considerate de Dawson și colab. (1981) ca „normale", deoarece ele revin la mărimea „naturală" după ce sînt transferate în medii

bogate în nutrienți. Aceste date fac ca morfologia normală și fiziologia bacteriilor din diferite medii naturale (în special acvatice, în care au fost urmărite mai ușor) să fie foarte controversate (Roszak și Colwell, 1987).

În apariția modificărilor morfologice și fiziologice caracteristice bacteriilor din unele medii naturale (ca, de exemplu, mediul oceanic) au fost emise două ipoteze:

1) După Novitsky și Morita (1978), morfologia și dimensiunile miniaturale ale bacteriilor marine autohtone ar fi o formă de răspuns la stress sau rezultatul unei strategii de supraviețuire determinată de mai multe diviziuni „reductive". Rezultatul lor este mărirea numărului celulelor individuale, fără creșterea biomasei lor. Acest proces duce la apariția unui număr mare de celule miniaturale *(ultramicrobacterii)*, care reprezintă forma caracteristică a bacteriilor autohtone în mediile marine.

2) După Sieburth (1979), celulele mici, rotunjite, din apa de mare ar fi în special forme de tranziție dintr-un mediu bogat (ape uzate, fecaloide sau îmbogățite cu îngrășăminte agricole etc.) la mediul natural oligotrof. Ele sînt expuse unui proces de subnutriție sau chiar în curs de înfometare și, deci, incapabile să desfășoare un metabolism normal.

După Roszak și Colwell (1987), gama largă a factorilor de mediu și marea lor variabilitate în mediile naturale la care bacteriile sînt nevoite să se adapteze, exclud existența unui set de condiții „normale" și, în consecință, o morfologie tipică în aceste medii. De aceea, în mod convențional, microbiologii utilizează în studiile sistematice și consideră ca tipică morfologia bacteriilor provenite din culturi tinere, în faza de creștere activă, pe medii corespunzătoare și în condiții optime de temperatură, tensiune de $O_2$, pH etc.

**Tehnicile de microscopie directă** utilizează diferite procedee: microscop fotonic cu cîmp clar sau întunecat, contrast de fază, cu lumină polarizată sau cu fluorescență.

Deși utilizate frecvent de unii cercetători, aceste tehnici au o serie de limitări importante:

1) sînt laborioase;

2) au un caracter relativ subiectiv, deoarece existența unor particule organice sau anorganice le pot masca prezența sau pot fi confundate cu microorganismele;

3) sînt relativ insensibile și expuse unor erori.

În mediile cu nutrienți limitanți, celulele bacteriene pot avea dimensiuni situate sub limita de rezoluție a microscopului fotonic ($<0{,}25$ μm), prezentîndu-se sub formă de celule „pitice", minibacterii, ultramicrobacterii.

*Tehnica numărării directe* are, de asemenea, o serie de dezavantaje: în cazul probelor de sol sau de sedimente, rezultatele depind de gradul de dispersare al agregatelor de microorganisme. În plus, nu deosebește celulele moarte de cele metabolic active. În unele medii naturale, acest raport a oscilat între 13 000 la 1 și 737 000 la 1 (Perfilev și Gabe, 1965).

*Examenul microscopic direct* poate furniza date importante privind diversitatea microorganismelor într-un microhabitat, modul în care sînt dispuse unele în raport cu celelalte etc. În general, aceste tehnici sînt greu de interpretat datorită, în principal, faptului că în mediile naturale bacteriile sînt adesea foarte mici și greu de deosebit de substanțele intercelulare. În plus, aceste tehnici nu pot releva o serie de date importante din punct

de vedere ecologic (activitatea metabolică, exigențele de nutriție, producerea de metaboliți, răspunsul la modificările mediului etc.). Acestea sînt obținute mai ales prin studii de laborator, care, chiar dacă mimează unele condiții naturale, nu pot reproduce unele esențiale (ca, de exemplu, relațiile de cooperare, de competiție etc.). Unii cercetători au recomandat utilizarea numărului microorganismelor pentru calcularea biomasei lor. Procedeul este aplicabil cel mult microorganismelor unicelulare, deși necesită măsurători foarte laborioase și expuse la numeroase erori.

Variabilitatea mărimii microorganismelor în mediile naturale, prezența formelor filamentoase și dificultățile tehnice fac, de regulă, conversia numărului în biomasă un procedeu inexact și inoperant din punct de vedere practic.

De importanță deosebită este examenul de microscopie electronică cu scanning, care evidențiază modul de grupare și interrelațiile dintre microorganisme, precum și raportul lor cu mediul neanimat.

**Utilizarea coloranților fluorescenți** este numai una dintre cele cîteva zeci de tehnici propuse pentru a diferenția celulele vii de cele moarte (Strugger, 1948; Korgaonkar și Ranade, 1966).

Bacteriile se colorează diferențiat cu acridin-oranj, în funcție de starea lor fiziologică, respectiv în roșu (bacteriile vii) sau în verde (cele metabolic inactive). Tehnica se bazează pe proprietatea colorantului de a se intercala în structura acizilor nucleici, dînd fluorescența roșu-oranj în asociere cu ARN și verde cu ADN (Roszak și Colwell, 1987). Un raport mare ARN/ADN este semnul unui metabolism activ, în timp ce un raport mic indică o inactivitate metabolică.

Teoretic valabilă, discriminarea celulelor vii de cele moarte pe baza culorii fluorescente este practic expusă frecvent erorilor determinate de concentrația colorantului, timpul de colorare, pH etc. Utilă pentru mediile acvatice și, în unele cazuri, chiar pentru sol, tehnica cu acridin-oranj permite decelarea unui număr de bacterii cu două ordine de mărime mai mare decît tehnica culturilor (de exemplu, $6{,}3 \times 10^5$ bacterii față de numai $3{,}2 \times 10^3$ în cazul culturilor).

Zimmerman și colab. (1978) au propus pentru decelarea și numărarea bacteriilor metabolic active în mediile naturale utilizarea proprietății sistemului transportor de electroni activ de a reduce clorura de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil-tetrazolium la clorura de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil-tetrazolium-formazan, care este depusă intracelular sub formă de agregate optic dense, de culoare roșie închis, suficient de mari pentru a fi vizibile la microscopul fotonic.

*Autofluorescența unor microorganisme* (cianobacterii, bacterii fotosintetizante, metanogene și microalge) poate fi folosită, de asemenea, pentru evidențierea celulelor vii, deoarece după moarte ele pierd treptat această proprietate.

*Tehnicile de imunofluorescență* permit evidențierea microorganismelor *in situ*, în general, cu mare specificitate datorită particularităților de interacțiune antigen—anticorp. Atît în varianta lor directă, cît și în cea indirectă s-au dovedit deosebit de utile în evidențierea microorganismelor din sol și medii acvatice, permițînd aprecieri cantitative asupra densității microorganismelor în mediul studiat.

Zarnea și colab. (1966, 1967) au demonstrat posibilitatea detectării bacteriilor din genul *Azotobacter* din sol, cu ajutorul serurilor imune anti-*A. chroo-*

*coccum*, *A. vinelandii* sau *A. agilis*. Tehnica are, pe lîngă avantajul deosebit al specificității, și unele inconveniente legate de: 1) dificultățile tehnice și de nevoia de seruri imune față de bacterii dovedite, cel puțin în cazul citat, ca slab imunogene; 2) nu deosebește celulele vii de cele moarte; 3) în cazul solului examenul microscopic este dificil, în special, din cauza fondului frecvent autofluorescent.

**Utilizarea substratelor artificiale** pentru studiul microorganismelor din sol și din mediile acvatice a reprezentat un progres în studiile de ecologia microorganismelor.

Una dintre cele mai vechi și mai simple tehnici — lama de microscop introdusă în sol sau în sedimente acvatice — se bazează pe capacitatea microorganismelor de a adera de suprafețele solide cu ajutorul polizaharidelor extracelulare, al fimbriilor sau al unor structuri specifice („crampoanele" de la *Caulobacter*) și de a se multiplica *in situ*. Această tehnică, propusă de Cholodnii și Rossi (1930, 1936), furnizează, după examinare la microscopul fotonic sau în contrast de fază, informații privind diversitatea microorganismelor existente în mediul respectiv. Ușor de interpretat, metoda este considerată ca utilă pentru studiul colonizării și al succesiunii microorganismelor în diferite medii, deși nu furnizează date privind natura sau activitatea lor. Cu toate acestea, „lama de sticlă" are o valoare limitată în mediile heterogene cum este solul deoarece:

1) introducerea, îndepărtarea și înlocuirea ei perturbă condițiile mediului natural;

2) prezența materialelor particulate organice sau anorganice îngreunează examenul microscopic și opacifiază lama de sticlă.

În studiile experimentale, lama de microscop poate fi înlocuită cu substrate analoge fizic și chimic celor ce sînt studiate (roci, materiale plastice) sau, în cazul studiilor de fuling, substratul expus acestui fenomen.

Perfiliev și Gabe (1969) au propus o perfecționare a tehnicilor de examinare directă, prin înlocuirea lamelor de microscopie cu microcapilare de sticlă turtite (cu secțiune rectangulară). Ele sînt de două tipuri: *pedoscoape* pentru studiul solului sau *peloscoape* pentru sedimentele acvatice (fig. 74). Ambele tipuri folosite ca atare sau umplute cu medii de cultură sînt introduse în habitat, pentru a fi colonizate de microorganismele care pătrund în interiorul lor, putînd fi examinate la microscop prin transparența peretelui lor.

Utilizînd această tehnică a fost posibil să se stabilească existența în mîlul unui lac a opt zone diferite, pe o distanță verticală de la suprafață spre fund de numai 2 mm. Ele corespund zonelor populate de următoarele microorganisme: 1) *diatomee* (fotosinteză); 2) *Gallionella* și *Ochrobium* (oxidare a Fe); 3) *Dictyobacter* (prădătoare); 4) *Azotobacter* (fixatoare de $N_2$); 5) *bacterii filamentoase* neidentificate; 6) *Cyclobacter;* 7) *Lieskeela*, *Thiospira* (oxidare ulfuri). Sub ultima zonă bacteriană, mediul conține FeS și prezintă condiții reducătoare.

Tehnica a permis, de asemenea, reconstituirea unor cicluri de viață *in situ*.

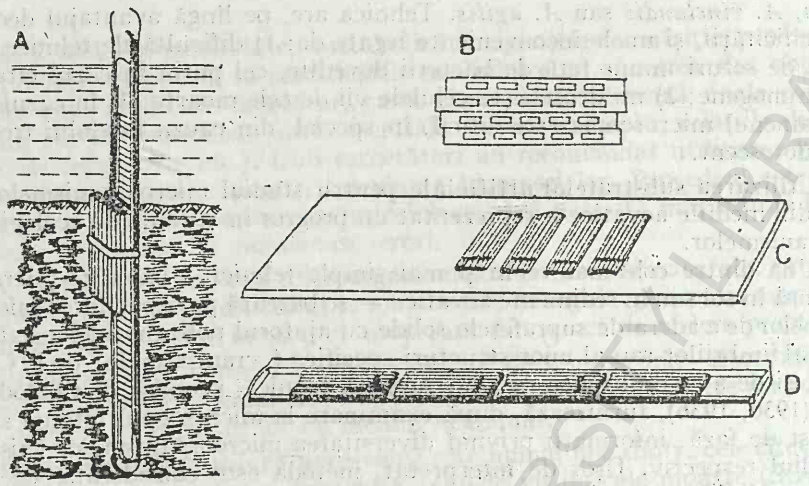



Fig. 74. — Peloscopul capilar tip Perfilev și Gabe. **A.** Peloscop inserat la interfața apă — mîl. **B.** Secțiune transversală prin capilare. **C.** Capilare montate pe o lamă de microscopie în vederea examinării. **D.** Capilare dispuse într-un dispozitiv protector cu lichid fixator.

### Metodele de cultivare

Limitele inerente tehnicilor de determinare directă a microorganismelor *in situ* au stimulat utilizarea metodelor de cultivare, prin însămînțarea suspensiilor diluate de sol, ape dulci sau marine pe medii de cultură solidificate.

În acest scop, probele sînt încorporate sau etalate pe suprafața unor medii de cultură cu agar, în plăci Petri, cu acceptarea tacită (dar cronată) că rezultatele ar fi relevante pentru situația din natură.

Tehnica are unele avantaje care decurg din:

1) posibilitatea de a izola, identifica și caracteriza biochimic, fiziologic sau genetic diferite microorganisme, deși niciodată nu se poate afirma dacă sînt active *in situ* sau cît de reprezentative sînt pentru asocierile de microorganisme din natură;

2) permite aprecieri utile asupra unor grupuri cu activități fiziologice riguros selective (fixatori de $N_2$, nitrificatori, denitrificatori, celulozo- sau chitinolitici etc.;

3) permite compararea numărului de microorganisme din două habitate diferite și densitatea lor relativă în mediu;

4) posibilitatea de a confirma faptul că mediul respectiv poate funcționa ca o sursă semnificativă pentru dispersarea unor microorganisme specifice în alte medii.

Valoarea ecologică a acestor tehnici este însă foarte limitată mai ales în studiile sinecologice cantitative și, oricum, nu explică interesul unor specialiști pentru practicarea în continuare a lor. Ele au dus, după Schmidt (1973), precum și după Karl (1986), la „o totală pierdere de timp și acumulare de date inutile".

Motivele principale sînt următoarele:

1) Mediile de cultură folosite în mod uzual, ca și celelalte condiții de studiu (temperatura de incubare, aero- sau anaerobioza, pH etc.) satisfac exigențele de dezvoltare ale unui număr limitat de microorganisme din spectrul larg

de populații existente în natură, dintre care, unele, necesită condiții foarte specifice de cultivare. Datorită diversității fiziologice a grupelor de microorganisme și condițiilor fizico-chimice ale microhabitatelor lor, nici un mediu de cultură și nici un set de condiții de creștere nu corespund decît exigențelor unui mic procent de microorganisme din orice mediu natural. Drept consecință, numărul coloniilor dezvoltate pe aceste medii este cu cîteva ordine de mărime mai mic decît cel real al bacteriilor metabolic active, deci nu este relevant pentru aprecierea biomasei. Cel puțin în unele cazuri (solul) este aproape imposibil de găsit un mediu atît de selectiv încît să permită dezvoltarea unei singure specii.

2) Teoretic, fiecare colonie este generată de o singură celulă bacteriană. Or, cel mai adesea, în natură, microorganismele se găsesc ca microcolonii sau agregate de celule, reunite prin fimbrii, glicocalix sau polizaharide de suprafață sau adsorbite pe coloizi. Numărul coloniilor formate în cazul unor medii naturale (solul) variază cu cîteva ordine de mărime în funcție de metodele utilizate pentru dispersarea lor (agitare magnetică, Waring blender, vibrații ultrasonice, agenți chimici de defloculare și surfactanți, variații de pH) (Zarnea și colab., 1959).

3) Datorită marii capacități a microorganismelor de a-și modula activitățile metabolice, multe dintre ele se pot dezvolta în condiții de laborator foarte îndepărtate de cele naturale, efectuînd diferite activități care nu au echivalent în mediile naturale. Un exemplu tipic este cel al bacteriilor patogene pentru om, care pot trece alternativ de la dezvoltarea sau supraviețuirea în sol, apă, gazde nevertebrate (insecte, căpușe etc.) la condițiile din organismul animal sau al mamiferelor, foarte bogate în nutrienți.

4) Mediile acvatice, în general, și cele marine, în particular, conțin două categorii de microorganisme: *copiotrofe (eutrofe)*, prezente în regiunile de coastă, estuarine etc., și *oligotrofe*, prezente mai ales în larg. Tehnicile curente de laborator utilizează medii bogate în nutrienți (>2 g C/l), care satisfac nevoile microorganismelor copiotrofe și selecționează aceste microorganisme în realitate atipice pentru mediile acvatice. Condiția oligotrofă sau periodic chiar de înfometare este mai aproape de starea naturală, cel puțin în mediile acvatice, ale căror bacterii autohtone necesită medii foarte sărace (1—15 mg C/l) și o incubare lungă (>7 zile) la temperaturi relativ reduse.

Excedentul de nutrienți și incubarea la temperaturi > 25°C pot avea efect inhibitor sau chiar toxic letal pentru unele microorganisme marine. Shilo (1980) consideră că oligotrofia este foarte răspîndită: 75% din suprafața biosferei și 90% din volumul ei sînt ocupate de biotopuri acvatice cu condiții de oligotrofie sub raportul concentrației de nutrienți.

Concluzia este că mediile de cultură standard sînt „anormale", pentru că nu seamănă cu cele din natură. Microorganismele „înfometate" sînt adesea mult mai apropiate de condiția naturală decît cele „supraalimentate" din culturile de laborator.

5) Metodele de cultivare pot pune în evidență sporii și alte forme de rezistență sau latență care generează colonii, deși nu sînt funcționale în natură.

6) Formele „necultivabile" ale bacteriilor. În anumite medii, un factor de eroare este reprezentat de existența unor bacterii viabile (testate ca avînd activitate metabolică cu metode fine), dar care nu formează colonii sau culturi după însămînțare în mediile uzuale de cultură. Acestea au fost considerate ca bacterii muribunde, care dispar una cîte una, sau ca forme particulare de latență. În realitate este probabil că prezența acestor bacterii este corelată cu

fenomenul de creștere neechilibrată („Unbalanced growth"), descris de Heinmets, Taylor și Lehman (1953). Ei caracterizează unele forme de stress, devenite necultivabile prin însămînțare directă în mediul complet, dar capabile să reia creșterea dacă sînt preincubate un timp scurt în prezența unor concentrații mici (0,1%) de metaboliți ca piruvatul, acetatul sau oxalacetatul. În aceste cazuri, datorită condițiilor de stress creșterea continuă, ca și procesele metabolice asociate cu sinteza ARN și a proteinelor în absența diviziunii celulare determinată de blocarea temporară a replicării ADN. Celulele pot deveni filamentoase, masa lor crește prin alungire sau prin „umflare". Metaboliții citați declanșează sinteza de ADN și, deci, diviziunea și, odată cu aceasta, posibilitatea de cultivare pe mediile uzuale de laborator.

### Determinarea biomasei microorganismelor

Biomasa (masa de material viu) reprezintă un parametru ecologic cu importanță majoră pentru caracterizarea unui ecosistem, deoarece măsoară prin greutatea C microbian viu cantitatea de energie stocată într-o comunitate biologică.

Metodele clasice utilizate în microbiologia generală pentru determinarea biomasei microbiene (greutate umedă sau uscată, cantitatea carbonului celular, a proteinelor etc.) sau deduse indirect din determinări de densitate optică și numărarea microorganismelor nu pot fi aplicate mediilor naturale. Marea heterogenitate a mediilor naturale și a populațiilor, spectrul variabil de mărime a celulelor individuale, prezența substanțelor organice sau anorganice asociate cu celulele vii fac imposibilă utilizarea lor. De aceea, practic, toate metodele sînt indirecte.

Principiul general admis este de a măsura o proprietate a microorganismelor corelată cu biomasa și de a calcula valoarea acesteia (în unități de greutate sau echivalente de energie), cu ajutorul unor factori de conversie, care traduc rezultatele într-un „sistem metric ecologic" mai universal. În general, factorii de conversie sînt determinați prin aprecierea unei proprietăți măsurată într-o cultură de laborator, care poate fi relativ ușor corelată cu greutatea C per unitate de volum. Ei furnizează, deci, un raport cantitativ între proprietatea măsurată și greutatea carbonului microbian. Validitatea factorilor de conversie este adesea îndoielnică deoarece nu există nici o garanție că determinările de laborator sînt valabile și în natură și nici o modalitate de a demonstra sau infirma acest lucru. Karl (1986) consideră că factorii de conversie nu au exactitatea celor din fizică și chimie. Ei sînt mai degrabă factori de extrapolare pentru că nu au acuratețea și nici corespondența cu realitatea caracteristice parametrilor efectiv măsurați.

**Metodele biochimice moderne** oferă posibilitatea de apreciere indirectă a biomasei totale sau a unor grupuri specifice de microorganisme. Ele sînt importante deoarece măsurătorile convenționale de C organic total, N total și proteine sînt nerelevante în studiile de ecologie datorită persistenței îndelungate a acestor substanțe în mediu mult timp după moartea și liza celulelor. De aceea, în general, se recurge la extracția și dozarea unei substanțe biologice specifice urmate de stabilirea unei corelații directe între cantitatea substanței măsurate și biomasa totală a microorganismelor.

Floodgate (1980), precum și Karl (1980, 1989) consideră că substratele utilizate ca indicator pentru „carbonul viu" trebuie să îndeplinească, la modul ideal, următoarele condiții:

1) să fie prezente în celulele vii ale tuturor microorganismelor sau ale subpopulațiilor lor specifice;

2) să fie ușor metabolizate, hidrolizate sau eliminate după moartea celulelor;

3) să fie prezente într-un procent uniform și constant în biomasa totală, indiferent de condițiile de mediu;

4) să poată fi extrase și, dacă este cazul, purificate, concentrate din probele recoltate și dozate cu o metodă sensibilă și relativ simplă.

Din nefericire, nici unul din substratele prezente în organismele vii nu îndeplinește riguros aceste condiții și, ca urmare, este necesar ca extrapolarea datelor obținute în biomasă să fie făcută cu prudența necesară. În plus, unele analize biochimice sînt laborioase și necesită intervenția unui laborator de specialitate.

### Determinarea ATP

Holm-Hansen și Booth (1966) au propus dozarea ATP (adenozin-5-trifosfat) ca principal test pentru aprecierea biomasei vii (carbonul organic) din mediile naturale.

Principalele argumente în favoarea acestui test sînt următoarele:

1) ATP este prezent în toate organismele vii datorită rolului său major și obligatoriu de purtător intermediar de energie chimică în celule, cu caracter de „monedă energetică universală a sistemelor biologice"*;

2) dispare foarte rapid din organismele moarte (durata de turnover în celulele bacteriene care cresc rapid este mai mică de o secundă ) și din formele latente, și nu este asociat, niciodată, cu detritusurile;

3) este relativ ușor de extras din asocierile de microorganisme și poate fi precis măsurat prin tehnici enzimatice, cromatografice sau radioizotopi;

4) studiile efectuate pe numeroase microorganisme au demonstrat existența unui raport destul de constant între concentrațiile ATP și C celular total, astfel încît se pot stabili corelații pe bază de greutate celulară sau de C organic: 1 μg ATP este echivalent cu 250 μg C din substanța vie.

Davis și White (1980) consideră că determinarea concentrației adeninnucleotidelor totale („total adenylate pool") $A_T$ după formula: $A_T = ATP + ADP + AMP$ ar fi o măsură mai bună a valorii biomasei decît simpla dozare de ATP, deoarece $A_T$ sînt practic insensibile la starea metabolică a celulelor.

Analizînd critic aceste date, Karl (1980) consideră că, în mod paradoxal, primul argument, a cărui valoare este indiscutabilă, este cel care creează unele limitări în interpretarea datelor și anume relația ATP/biomasă. Ea își păstrează valabilitatea totală în anumite medii (ape reziduale din mine, habitatele oceanice abisale, mediile constant anoxibiotice etc.) în care bacteriile sînt singurele organisme existente sau oricum măcar dominante.

Situația este mult mai complicată în cercetările ecologice referitoare la transportul de energie și la productivitatea organică în ecosistemele complexe, heterogene, care necesită disocierea comunității în compartimentele trofice individuale.

Anterior, Holm-Hansen și Paerl (1972) au propus o tehnică de estimare a contribuției relative a bacteriilor și algelor la biomasa (C organic) din mediile

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 130.

acvatice. Ei apreciază cantitatea de C bacterian prin calcularea diferenței dintre ATP total din biomasă (C) și cantitatea de C din fitoplancton, apreciată prin numărarea, identificarea directă microscopică și măsurarea celulelor acestuia.

Aplicată cu rezultate bune în unele ecosisteme heterogene, metoda are defectul că ignoră cantitatea de C din microzooplancton.

*Principiul dozării ATP.* Una din tehnicile cele mai rapide și reproductibile se bazează pe fenomenul de bioluminescență în sistemul luciferină/luciferază de la licurici, în care producerea de lumină în cursul reacției enzimatice este proporțională cu concentrația ATP (pentru fiecare moleculă de ATP degradată este eliberat un foton), după reacția:

$$E + LH_2 + ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} E \cdot LH_2 \cdot AMP + PP \quad (1)$$

$$E \cdot LH_2 \cdot AMP + O_2 \rightarrow E + AMP + CO_2 + h\nu + T \quad (2)$$

în care: E = luciferaza din licurici; $LH_2$ = luciferină redusă; $h\nu$ = emisia de lumină cu $\lambda = 550$ nm; PP = pirofosfat anorganic; AMP = adenozin-monofosfat; T = tiazolidină (dihidroluciferină).

După Karl (1980), cantitatea de ATP din celulele bacteriene care cresc exponențial ar fi reglată la valori cuprinse între 2,0 și 6,0 nanomoli ATP/mg celule/greutate uscată. Valoarea ATP în celulele care cresc pare să fie constantă și dependentă de compoziția mediului de cultură. În condiții de înfometare, cantitatea de ATP scade.

Fiabilitatea tehnicii a fost studiată experimental în condiții de laborator. Pe baza analizei a 538 de probe s-a stabilit un indice de corelație > 97% între concentrația ATP și numărul bacteriilor viabile (apreciat prin capacitatea de a produce colonii pe mediile solidificate de cultură.

Rezultatele obținute sînt foarte diferite în funcție de mediul studiat: în anumite habitate acvatice (lacuri eutrofizate, regiunea de coastă a mărilor etc.), cantitatea de C viu microbian poate reprezenta 90—100% din cantitatea totală de C organic particulat. În alte habitate (adîncul mărilor, sol, sedimente), biomasa vie reprezintă mai puțin de 1% din C total (Karl, 1986). Figurile 75 și 76 (după Holm-Hansen) ilustrează distribuția ATP în oceane, în raport cu adîncimea și respectiv variațiile C organic total particulat și ale C organic total din celulele vii în aceleași condiții.

Deși este relativ simplă și poate fi aplicată unui număr mare de probe, determinarea ATP are o serie de dezavantaje:

1) Unele microorganisme își modifică radical conținutul în ATP cînd se schimbă condițiile fiziologice, în general, și cele de nutriție în special.

2) Cantitatea de ATP sau $A_T$ măsoară „biomasa protoplasmatică" (Karl, 1986). Ea nu măsoară cantități importante de C structural din pereții celulari, materialul capsular, mucus, secreții celulare etc., care, în anumite condiții de mediu, pot reprezenta o proporție semnificativă din biomasa totală.

3) În unele medii (sol, sedimente, mediile marine de coastă sau estuarine etc.), adsorbția ATP pe diferite particule interferă cu extracția și cuantificarea lui.

4) Prezența celulelor vegetale și animale vii limitează aplicabilitatea metodei în anumite ecosisteme.

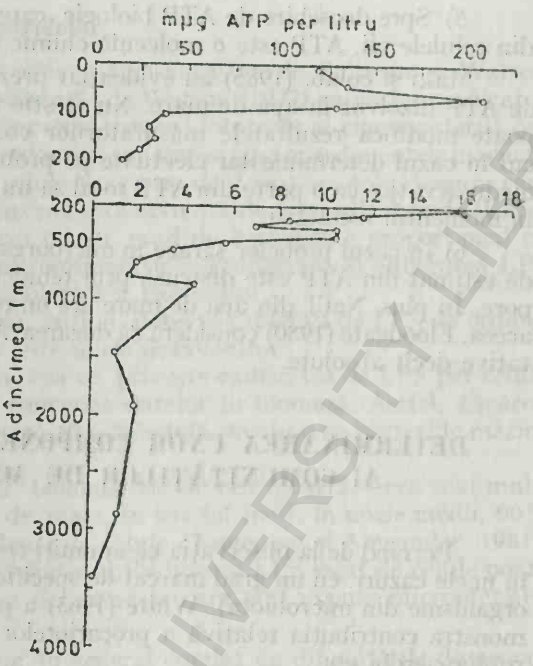



Fig. 75. — Distribuția ATP în nanograme [mμg] în raport cu adîncimea în Oceanul Pacific de est. De notat scala diferită folosită pentru adîncimi între 0 — 200 m și respectiv 200 — 400 m. Concentrațiile ridicate la suprafață (0—150 ng) în zona eufotică ar putea fi rezultatul mecanismelor de concentrare fizică a biomasei sau al multiplicării bacteriilor în acest habitat (biofilme). În regiunea abisală, concentrația ATP scade la 0,5 — 2,0 ng/l (după Holm-Hansen, 1971).

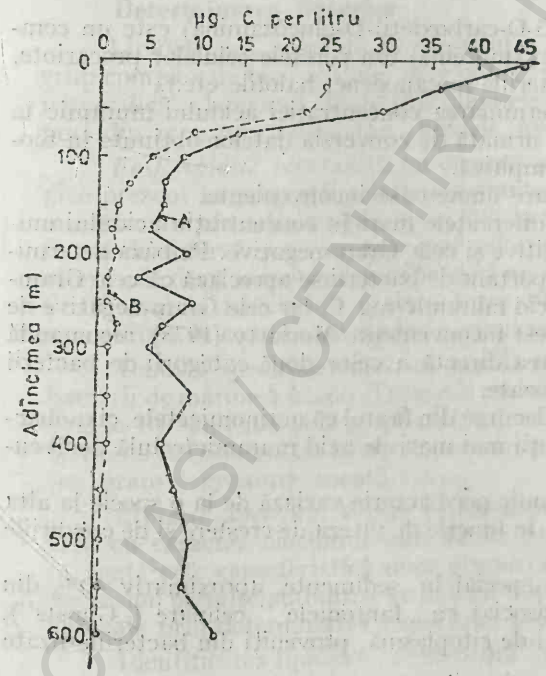



Fig. 76. — Distribuția carbonului organic total particulat (A) și a carbonului organic din organismele vii estimat prin ATP × 250 (B) în funcție de adîncimea mediului marin. În zona eufotică, 50—100% din C organic este „viu". Pe măsură ce adîncimea coloanei de apă crește, proporția lui scade la 5—10%, la 200—300 m, și la 1%, la adîncimi de 1 500 m (după Holm-Hansen, 1971, și Karl, 1980).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5) Spre deosebire de ATP biologic, care este foarte labil, după extracția din celulele vii, ATP este o moleculă chimic foarte stabilă (Karl, 1980, 1986).

Maki și colab. (1983) au evidențiat prezența unor cantități semnificative de ATP dizolvat în apa de mare. Nu se știe în ce măsură acest ATP „liber" poate modifica rezultatele măsurătorilor convenționale. Oricum, există riscul în cazul determinărilor efectuate pe probe din sol, din sedimente sau din medii acvatice ca o parte din ATP total să nu fi fost asociat cu organismele vii în momentul recoltării.

6) În cazul probelor sărace în microorganisme (apa marină), o parte greu de estimat din ATP este distrusă prin tehnicile de concentrare pe filtre Millipore. În plus, NaCl din apa de mare are un efect inhibitor asupra reacției. De aceea, Floodgate (1980) consideră că dozarea ATP oferă mai degrabă date orientative decît absolute.

## DETERMINAREA UNOR COMPONENȚI CHIMICI SPECIFICI AI COMUNITĂȚILOR DE MICROORGANISME

Pornind de la observația că anumiți constituenți biochimici sînt întîlniți în unele cazuri, cu un grad marcat de specificitate (limitați exclusiv la anumite organisme din microbiota), White (1963) a propus utilizarea lor pentru a demonstra contribuția relativă a procariotelor față de eucariote și raportul aerobi/anaerobi etc.

### Determinarea acidului muramic

Acidul muramic (2-amino-3-O-carboxietil-D-glucozamina) este un component major al peptidoglicanului (mureina) din peretele celulelor procariote, cu excepția arhebacteriilor (bacteriile metanogene, halofile etc.).

Tehnica se bazează pe determinarea concentrației acidului muramic în mediile acvatice și în sedimente, urmată de conversia datelor obținute în biomasă, utilizînd o formulă cvasiempirică.

Interpretarea rezultatelor are numeroase inconveniente:

1) Practic, tehnica ignoră diferențele mari în concentrația acidului muramic dintre bacteriile Gram-pozitive și cele Gram-negative. Pe baza determinărilor efectuate la un număr important de bacterii se apreciază că cele Gram-pozitive au un raport de 44 μg acid muramic/mg C, iar cele Gram-negative de 12 μg/mg C. Pentru a atenua acest inconvenient, Moriarty (1978) recomandă corelarea datelor cu numărătoarea directă a celor două categorii de bacterii în probele de sediment omogenizate.

2) Un alt factor de eroare decurge din faptul că actinomicetele, cianobacteriile și endosporii au concentrații mai mari de acid muramic/celulă decît eubacteriile.

3) Cantitatea de acid muramic per bacterie variază de la o specie la alta și chiar în cadrul aceleiași specii, în funcție de viteza de creștere și de condițiile de mediu.

4) În mediile naturale, în special în sedimente, aproximativ 40% din acidul muramic total poate fi asociat cu „fantomele" celulare („Ghosts"), respectiv ca pereți celulari lipsiți de citoplasmă, proveniți din bacteriile lizate (Karl, 1986).

### Determinarea lipopolizaharidelor

Recomandată pentru bacteriile Gram-negative de Sullivan și Watson (1974), această tehnică este considerată de Watson (1977) ca un bun indicator pentru biomasa procariotă (eubacterii, bacterii fototrofe și cianobacterii) din mediul marin, în care acestea predomină (nu însă și pentru sedimentele marine).

Se utilizează un lizat de celule sanguine de *Limulus polyphemus*, care conțin o enzimă și o proteină. Enzima este activată de lipopolizaharide (LPS), determinînd precipitarea proteinei cu un grad de turbiditate proporțional cu cantitatea de LPS (apreciat spectrofotometric). Producerea și eliberarea LPS pare să fie corelată cu starea fiziologică a bacteriilor.

Tehnica este foarte sensibilă, putînd detecta cantități de LPS de ordinul femtogramelor (1 fg $= 10^{-15}$ g). Are unele dezavantaje:

1) Există diferențe mari în ceea ce privește cantitatea de LPS per celulă bacteriană, fapt care complică conversia datelor în biomasă. Astfel, *Escherichia coli* conține în faza logaritmică 49,6 fg/celulă, în timp ce bacteriile marine numai 2,78 fg/celulă.

2) Tehnica nu diferențiază biomasa vie de cea moartă. Ceva mai mult, LPS persistă mult timp în apa de mare, în așa fel încît, în unele medii, 90% din LPS totale pot fi independente de celule (Jorgensen și Alexander, 1981).

După Karl (1986), raportul dintre LPS liber și LPS legat de celule poate furniza informații privind starea de stress la care sînt expuse microorganismele în mediu.

Tehnica are un preț ridicat, în general corelat cu dificultățile de procurare a sursei de enzimă (*Limulus*).

### Determinarea lipidelor

Lipidele sînt prezente în constituția microorganismelor sub forma unui grup complex de biomolecule, care pot fi evidențiate și dozate, fie ca o măsură nespecifică a biomasei totale (fosfolipidele), fie pentru prezența anumitor grupuri din structura populației (lipidele specifice).

*Fosfolipidele* reprezintă un compus major al tuturor membranelor biologice prezent în proporții relativ constante. Ele formează ~ 98% din lipidele membranare ale eubacteriilor și ~ 50% la alte organisme. Nu sînt prezente sub formă de rezervă și au un turnover relativ rapid. Sînt degradate în natură în cîteva zile după moartea celulelor, deci nu se acumulează în materialul detritic. Conținutul în fosfolipide variază între 10 și 100 μmoli/g greutate uscată și se modifică în condiții de stress în cazul unei specii date în limita a 30—50%.

Tehnica spectrofotometrică uzuală permite detectarea biomasei a $\sim 10^9$ bacterii de mărimea *E. coli*. Tehnicile mai noi pot detecta fosfolipidele corespunzînd la $10^6$ sau chiar la $5 \times 10^5$ celule de mărimea *E. coli*. Pentru determinarea biomasei se folosește un factor de conversie bazat pe relația 50 μ moli fosfolipide per gram$^{-1}$ greutate uscată.

*Lipidele specifice.* White (1983) acordă o importanță deosebită unor lipide cu caracter biochimic specific de marker („Signature lipids"), a căror prezență este caracteristică unor grupuri majore de microorganisme. Evidențierea lor permite stabilirea structurii populaționale a comunităților biologice naturale prin determinarea raportului procariote/eucariote.

Identificarea lipidelor „semnătură" este abia la început, dar au fost semnalate cîteva absolut tipice:

1) Pentru *bacterii:* acidul cis-vaccinic (15 atomi C), acidul 10-metil palmitic, acizii monoenoici (cu 15 și 17 C), fosfolipide mai bogate în glicerol decît în fosfat la nivelul grupărilor polare etc.

2) Pentru *microflora eucariotă:* acizii grași polienoici (cu 20 atomi C) și acizii alfa-linolenici nesaturați.

3) Pentru *microfaună:* acizii gama-linolenici nesaturați.

### Determinarea clorofilei și a altor pigmenți fotosintetizanți

Concentrația clorofilei *a* [chl *a*] reprezintă, în absența plantelor verzi, un indicator semnificativ al biomasei microalgelor și cianobacteriilor, deoarece este comună tuturor taxonilor din mediile acvatice.

După extracția cu metanol sau acetonă, se determină cantitatea de [chl *a*] prin examinare spectrofotometrică, utilizînd o lungime de undă $\lambda = 665$ nm.

Metoda are avantajul că variind lungimea de undă (spre exemplu la $\lambda = 850$ nm) pot fi determinați și alți pigmenți fotosintetizanți, aparținînd bacteriilor fototrofe care absorb lumini cu $\lambda$ diferite.

Tehnica are unele dezavantaje:

1) În primul rînd, rezultatele se corelează, în general cu concentrația de ATP, nu însă și cu biomasa.

2) Raportul [chl *a*] /C organic variază semnificativ nu numai de la o specie de alge la alta, ci chiar în cadrul aceleiași specii (uneori de 25 de ori, după Karl, 1986), în funcție de condițiile de mediu (temperatură, iluminare), dar și de mărimea celulei, nutrienți, viteza de creștere etc. De aceea, extrapolarea rezultatelor dozării [chl *a*] în biomasa fitoplanctonică este dependentă de existența unor informații suplimentare privind compoziția în specii, concentrația nutrienților, intensitatea luminii etc.

3) Dozarea clorofilei se bazează pe observația că ea are o durată relativ scurtă de existență extracelulară, fiind degradată prin fotooxidare, pe cale enzimatică sau de către microorganisme. Cu toate acestea, Jeffrey și Hallgraeff (1980) au semnalat cazul unor medii acvatice în care numai 50—70% din [chl *a*] determinată spectrofotometric era sub formă de molecule intacte, în timp ce restul era reprezentat de produși de degradare, după cum s-a demonstrat în cazul culturilor de alge în curs de descompunere.

## ACTIVITATEA METABOLICĂ

Activitatea metabolică (termen vag și criticabil după Karl, 1987) exprimă capacitatea microorganismelor de a modifica mediul în care trăiesc. Ea poate fi măsurată în funcție de transformările energiei și/sau ale materiei. Cel mai adesea, cei doi factori sînt interrelați: energia este frecvent derivată din utilizarea materiei și este stocată în substanță materială.

Primele încercări de cuantificare a rolului microorganismelor în diferite medii naturale (în special, în sol și ape) s-au bazat, în lipsa unor metode specifice, pe tehnicile cele mai accesibile și mai simple de determinare a numărului lor global și/sau a unor grupuri fiziologice, utilizînd, după caz, fie numărătorile directe, fie cultivarea în laborator. Ele porneau de la premisa că numărul microorganismelor este corelat pozitiv cu activitatea metabolică și cu potențialul de creștere și multiplicare. Ulterior, odată cu perfecționarea tehnicilor de explorare a fost demonstrat caracterul arbitrar al acestor deducții.

Pe măsură ce s-au perfecționat tehnicile de determinare a biomasei s-a ajuns la concluzia că mărimea acesteia ar reprezenta un indicator mai semnificativ pentru activitatea microorganismelor în habitatele lor naturale decît aprecierile numerice. Curînd, și această concepție a fost infirmată, deoarece nu ține seama de variațiile mari ale intensității metabolismului la diferite organisme.

Un caz tipic pentru lipsa de corelație dintre biomasă și activitatea metabolică decurge din numeroasele exemple care demonstrează fără echivoc faptul că raportat la biomasă, viteza metabolismului scade pe măsură ce masa lor crește (tabelul nr. 15).

*Tabelul nr. 15*

**Relația dintre $QO_2$, mărimea celulei și cantitatea de oxigen consumat per celulă/oră, în condiții de laborator** (după Campbell, 1977, modificat)

| Microorganismul | $QO_2$* | Greutatea umedă** a unei singure celule | µl oxigen consumat per celulă/oră |
|---|---|---|---|
| *Acetobacter chroococcum* | 6 000 | $2,2 \times 10^{-9}$ | $2,6 \times 10^{-4}$ |
| *Pseudomonas fluorescens* | 60 | $1,7 \times 10^{-10}$ | $2,0 \times 10^{-3}$ |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 95 | $7,0 \times 10^{-8}$ | $1,3 \times 10^{-6}$ |
| *Chlorella vulgaris* | 70 | $3,0 \times 10^{-8}$ | $4,0 \times 10^{-7}$ |
| *Paramecium aurelia* | 6 | $5,0 \times 10^{-4}$ | $6,2 \times 10^{-4}$ |

* µl $O_2$/mg greutate uscată/oră.

** Presupune un conținut în apă de 80% raportat la greutate.

Pe baza coeficientului $QO_2$ (cantitatea de $O_2$ consumată de un microorganism exprimată în µl/mg greutate umedă/oră) rezultă că o singură celulă a unui protozoar poate avea o masă egală cu aceea a unui milion de bacterii cu dimensiuni medii. În schimb, activitatea sa metabolică poate fi egală cu aceea a unei singure bacterii. Este probabil că și alte activități metabolice sînt corelate în mod asemănător.

În prezent, datorită progreselor tehnice a devenit posibilă măsurarea directă a unor activități metabolice ale microorganismelor, deși este greu de afirmat că ele reflectă efectiv activități proprii și în ecosistemele naturale.

În primul rînd, cele mai multe tehnici implică o perturbare a stării naturale a microhabitatelor și a acelor condiții care determină sau influențează activitatea microorganismelor. În plus, măsurătorile activității nu reușesc să furnizeze informații privind măsura în care catabolismul este cuplat cu creșterea (mărirea masei celulare) sau cu diviziunea (care implică sinteza de ADN). Or, în natură, creșterea poate avea loc fără diviziune celulară. De asemenea, în anumite condiții, în particular, în cazul bacteriilor înfometate, diviziunea celulară poate avea loc fără creșterea biomasei celulare și fără o activitate metabolică intensă.

Un alt factor semnificativ de eroare decurge din existența unor microorganisme metabolic active, dar ineficiente (produc puțin ATP și o cantitate mică de biomasă), dar care, datorită formării excesive de produși de metabolism și efectelor posibile determinate de termogeneză, pot avea un impact mai mare asupra mediului decît în celulele care cresc rapid.

Determinarea activității metabolice totale a unui mediu natural este virtual imposibilă datorită marii diversități a grupurilor fiziologice de microorganisme și a proceselor lor metabolice. Este necesar, în plus, să se excludă activitățile metabolice ale microorganismelor, precum și cele care țin de intervenția enzimelor extracelulare. Acest ultim deziderat este virtual imposibil de realizat în cele mai multe cazuri.

### Determinarea $O_2$ și $CO_2$

Măsurarea directă a modificărilor în concentrația $O_2$ și/sau $CO_2$ este utilizată frecvent pentru a aprecia viteza proceselor de fotosinteză sau ale metabolismului heterotrof în mediile acvatice. Numeroase studii au demonstrat existența unei relații cantitative între consumul de $O_2$, degajarea de $CO_2$ și activitatea microorganismelor. Pe bază molară, cantitatea de $CO_2$ eliberat trebuie să fie aproximativ egală cu cea a $O_2$ consumat.

Karl (1987) citează experiențele lui Pamamat (1968), care a arătat că în anumite medii marine bentice, coeficientul respirator ($QR = CO_2/O_2$) variază între 0,27 și 1,35. Explicația rezidă în faptul că numeroase procese care afectează producerea de $CO_2$ în mediile anaerobe (fermentații, denitrificare, reducere $SO_4^{2-}$), precipitarea sau dizolvarea carbonatului de calciu, consumul abiotic de $O_2$, prezența microorganismelor chemolitotrofe sau schimburile $CO_2 \rightleftharpoons O_2$ cu atmosfera pot afecta relația normală stoichiometrică dintre $O_2$ și $CO_2$. De aceea, Karl consideră că determinarea asociată a celor două gaze este mai edificatoare pentru măsurarea activităților respiratorii.

Crawford și colab. (1977) au utilizat eliberarea $^{14}CO_2$ din substrate marcate, pentru a studia viteza descompunerii lor prin mineralizare la compuși anorganici. Utilizînd lignoceluloză marcată cu $^{14}C$ în diferite regiuni ale moleculei au putut identifica proveniența $^{14}CO_2$ degajat.

Procedeul este deosebit de util pentru studiul substanțelor organice de sinteză de tipul pesticidelor în vederea stabilirii biodegradabilității lor. Marcarea diferențiată a moleculei cu $^{14}C$ permite să se stabilească dacă există porțiuni nedegradabile, care se pot acumula în mediu.

### Activitatea enzimatică

A fost studiată, în special, în sol, în care activitatea enzimatică totală este rezultatul participării a trei componente:

1) *enzimele intracelulare*, active atît în celulele viabile, cît și în cele moarte rămase intacte;

2) *enzimele extracelulare libere* în soluția solului sau atașate de celulele vii;

3) *enzimele extracelulare* „imobilizate" legate prin asociere cu coloizii din sol (fig. 77).

Contribuția celor trei componente la activitatea enzimatică globală variază considerabil, în timp, precum și de la un tip de sol la altul sau de la o enzimă la alta. Enzimele extracelulare sînt fie eliberate din celulele vii, fie după moartea acestora asociate cu liza celulară; în acest ultim caz, ele sînt, în realitate, enzime intracelulare devenite, prin acest efect, extracelulare. Enzimele extracelulare au fost evidențiate atît în mediile terestre, cît și în cele acvatice.

Unii cercetători se referă la activitatea enzimelor „particulate" pentru a diferenția activitatea determinată de celulele care cresc de a celulelor metabolic active, dar neproliferante, sau de a enzimelor libere adsorbite pe particule. Termenul este nerecomandabil.

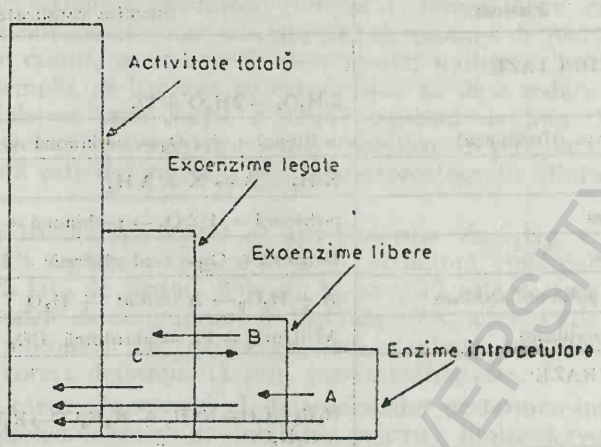



Fig. 77. — Componenții activității enzimatice a solului. A. Enzime eliberate după liza celulelor. B. Exoenzime care devin legate de coloizii din sol. C. Eluarea enzimelor legate (după Burns, 1977).

Prezența unor enzime în sol poate fi asociată cu microbiota totală a solului, în timp ce alte enzime sînt corelate cu activitatea unor grupuri specifice de microorganisme (eubacterii, actinomicete, fungi etc.). Astfel, lipazele, proteazele, amilazele și dehidrogenazele sînt considerate ca ubicvitare, datorită prezenței lor constitutive la toate organismele studiate. Valorile lor sînt frecvent corelate cu biomasa și/sau cu activitatea metabolică. Altele (fosfataza alcalină, nitrat reductaza etc.) sînt inductibile. În sfîrșit, altele sînt specifice unui anumit grup de microorganisme (nitrogenaza, luciferaza, chitinaza) și, ca atare, activitatea lor poate evidenția un anumit grup specific și diversitatea fiziologică a populațiilor de microorganisme.

Enzimele din sol (tabelul nr. 16) efectuează o mare varietate de reacții, acționînd ca oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, liaze etc., frecvent la distanță de locul lor de origine. În anumite condiții de mediu pot fi rapid denaturate și limitate ca acțiune în timp, pe cînd legate de coloizii din sol, ele persistă timp îndelungat, fiind în mod deosebit protejate de componenții humusului.

**Măsurarea activității enzimatice** a solului a fost efectuată pentru un număr mare de enzime a căror semnificație biologică este cunoscută.

Kiss, Drăgan-Bularda și Rădulescu (1975) semnalează importanța deosebită a activităților enzimatice în fazele inițiale ale descompunerii resturilor organice de proveniență vegetală și animală, în particular, a acelor implicate în circulația unor elemente biogene în natură (C, N, S, P).

Karl (1986) relevă, de asemenea, marea utilitate a determinării activității enzimelor implicate în asimilarea N de către microorganisme (nitrat reductaza (NaR), nitrit reductaza (NiR), glutamat dehidrogenaza (GDH),

*Tabelul nr. 16*

**Principalele enzime din sol**
(după Thornton și Mc Lauren, 1975)

| Enzima | Reacția catalizată |
|---|---|
| OXIDOREDUCTAZE | |
| Catalaza | $2\ H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ |
| Catechol oxidaza (tirozinaza) | o-difenol + $1/2\ O_2$ → o-chinonă + $H_2O$ |
| Dehidrogenaza | $X\ H_2 + A \rightarrow X + A\ H_2$ |
| Difenol oxidaza | p-difenol + $1/2\ O_2$ → p-chinonă + $H_2O$ |
| Glucoz-oxidaza | Glucoză + $O_2$→ acid gluconic + $H_2O_2$ |
| Peroxidaza și polifenol oxidaza | $A + H_2O_2 \rightarrow$ A oxidat + $H_2O$ |
| Uricaza (urat oxidaza) | Acid uric + $O_2$ → alantoină, $CO_2$ |
| TRANSFERAZE | |
| Transaminaze | $R_1R_2{-}CH{-}N^+H_3 + R_3R_4CO \rightarrow R_3R_4{-}CH{-}N^+H_3 + R_1R_2CO$ |
| Transglicozilaze și levan sucraze | $nC_{12}H_{22}O_{11} + ROH \rightarrow H(C_6H_{10}O_5)nOR + n(C_6H_{12}O_6)$ |
| HIDROLAZE | |
| Acetilesteraze | Ester acetic + $H_2O$→alcool + acid acetic |
| α- și β-amilaze | Hidroliza legăturii 1,4-glucozidice |
| Asparaginaza | Asparagină + $H_2O \rightarrow$ aspartat + $NH_3$ |
| Celulaze | Hidroliza legăturilor β-1,4-glucan |
| Deamidaze | Amida acidului carboxilic + $H_2O$→acid carboxilic + $NH_3$ |
| β-fructofuranozidaza (invertaza, sucraza, zaharaza) | β-fructofuranozida + $H_2O \rightarrow$ ROH + fructoză |
| α- și β-galactozidaza | Galactozid + $H_2O$→ROH + galactoză |
| α- și β-glucozidaza | Glucozid + $H_2O \rightarrow$ ROH + glucoză |
| Inulaza | Hidroliza legăturilor β-1,2-fructan |
| Lichenaza | Hidroliza legăturilor β-1,3-celotrioză |
| Lipaza | Trigliceride + $3H_2O \rightarrow$ glicerol + 3 acizi grași |
| Metafosfataza | Metafosfat → ortofosfat |
| Nucleotidaza | Defosforilarea nucleotidelor |
| Fosfataza | Ester fosfat + $H_2O \rightarrow$ ROH + fosfat |
| Fitaza | Inozitol hexafosfat + $6\ H_2O \rightarrow$ inozitol + 6 fosfat |
| Proteaza | Proteine → peptide și aminoacizi |
| Pirofosfataza | Pirofosfat + $H_2O \rightarrow$ 2 ortofosfat |
| Ureaza | Uree → $2\ NH_3 + CO_2$ |

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

glutamin sintetaza/glutamin-2-oxiglutarat aminotransferaza (GS/GOGAT) și nitrogenaza), precum și a celor care determină activitatea sistemului transportor de electroni.

Tehnicile convenționale recurg la urmărirea modului de dispariție a substratului de acțiune a enzimelor (timpul de înjumătățire, cantitatea sau % de substrat utilizat etc.) sau a cantității de produși de reacție ce apar în mediu. În alte cazuri, se recurge la determinări indirecte. Dozarea nitrogenazei, spre exemplu, se bazează pe capacitatea sa de a reduce diferite substraturi nefiziologice care conțin o triplă legătură de tipul $N \equiv N$, $N \equiv C$, $C \equiv C$. În consecință, nitrogenaza reduce acetilena ($C_2H_2$) la etilenă ($C_2H_4$) a cărei prezență este determinată prin gaz-cromatografie (Burns, 1965; Dilworth, 1966).

Testul se bazează pe faptul că atît molecula de $C_2H_2$, cît și cea de $N_2$ au o triplă legătură, precum și o structură moleculară similară, complementară față de situsul activ al $N_2$-azei. El este de zece ori mai sensibil decît metodele de determinare a înglobării $^{15}N_2$ și de o mie de ori decît tehnicile convenționale. De asemenea, are avantajul specificității, pentru că $C_2H_2$ este corect determinată prin gaz-cromatografie.

În unele cazuri, în special al determinărilor pe termen lung este necesară tratarea probei de sol cu un inhibitor, pentru a limita dezvoltarea microorganismelor. Acest obiectiv este greu de realizat fără a produce și liza concomitentă a unei părți din microorganisme, asociată cu eliberarea enzimelor intracelulare.

Ca și celelalte tehnici de studiu al activității microorganismelor în mediile naturale, aprecierea activității enzimatice prezintă o serie de dificultăți tehnice și de interpretare. În mod particular, procedeele de extracție sînt laborioase și greu de practicat pe un număr mare de probe.

Rezultatele sînt influențate, în primul rînd, de condițiile de lucru din laborator (temperatură constantă recomandabil 25°C, pH, umiditate, agitare etc.) foarte diferite de cele din natură, ca și de eficiența redusă a tehnicilor de extracție, asociate frecvent cu distrugerea unor cantități importante de enzime. De asemenea, un rol important îl au:

1) prezența plantelor superioare și, în mod particular, efectele rizosferei;

2) gradul de afînare a solului și implicit capacitatea de înmagazinare a apei și aerului (Kiss, Ștefanic și colab., 1991);

3) adîncimea de la care a fost prelevată proba (activitatea enzimatică scade cu adîncimea);

4) prezența îngrășămintelor minerale și a compușilor organici;

5) tipul de sol, ca și variațiile sezoniere de temperatură și umiditate;

6) influența fenomenelor de adsorbție pe fracțiunea coloidală a solului etc.

**Valoarea determinărilor de activitate enzimatică.** După Karl (1986), măsurarea activității enzimelor specifice în probele de medii naturale furnizează informații utile privind starea fiziologică a comunităților de microorganisme din natură și permite aprecierea transformărilor biochimice ce au loc *in situ*. Frecvent, sursa activității enzimatice este greu de demonstrat, deoarece ea reprezintă, în fapt, însumarea activităților derivate de la microorganisme, plante și animale. De aceea, atribuirea în orice condiții a unei origini exclusiv microbiene este eronată. Datele furnizate reprezintă un indicator bun pentru activitatea biochimică a solului, oricum superior celui reprezentat

de numărul microorganismelor. De altfel, frecvent, valorile celor doi parametri se corelează pozitiv. În absența microorganismelor nu există o activitate bogată, ceea ce sugerează o contribuție dominantă a activităților enzimatice intracelulare (Burns, 1983).

Deși datele sînt frecvent corelate cu gradul de fertilitate a solului, în general, se consideră că estimarea acestuia prin prisma activităților enzimatice și, mai ales, a unei singure enzime este imprudentă. Aceasta datorită complexității factorilor care influențează sinteza, eliberarea, persistența și disponibilitatea enzimelor în sol, precum și dificultăților tehnice care pot influența rezultatele. Într-un studiu aprofundat, Kiss și colab. (1991) demonstrează posibilitatea de a modula activitatea enzimelor din sol în cazul ureazei cu ajutorul inhibitorilor, în vederea măririi eficienței fertilizării cu uree.

### Microcalorimetria

Această metodă măsoară degajarea de căldură în cursul proceselor metabolice microbiene, ca rezultantă a proceselor exotermice ale catabolismului și a celor endotermice ale anabolismului.

Reprezintă, după Karl (1987), una din măsurătorile cele mai puțin specifice, deoarece căldura este asociată cu creșterea metabolică a tuturor grupurilor fiziologice. Ca atare, microcalorimetria este deosebit de utilă pentru studiul comunităților complexe de microorganisme din sol și sedimentele acvatice, precum și pentru aprecierea intensității potențialului de degradare a compușilor chimici.

Tehnica are o serie de dezavantaje legate de modificarea activității globale a microorganismelor în cursul transportului probelor, de producere simultană de căldură prin reacții chimice, de expunerea unor probe anoxice la contactul cu aerul etc. Ele fac incertă extrapolarea valorilor măsurate în laborator la situația din natură și diminuează semnificația metodei, care beneficiază în prezent de o aparatură modernizată pentru ecologia microorganismelor.

**Încorporarea nucleotidelor marcate** se bazează, teoretic, pe faptul că în celulele care cresc, ADN este sintetizat cu o viteză proporțională cu biomasa și că, în consecință, viteza sintezei ADN reflectă viteza de creștere a microorganismelor. În general, se utilizează ca marker [$^3$H] timidina, iar decelarea microorganismelor active se face prin autoradiografie.

Tehnica are avantajul că ADN este singura macromoleculă care nu este supusă în celulele vii procesului de turnover, iar sinteza ei nu are loc în celulele care nu cresc. În bacteriile care cresc exponențial, sinteza ADN are loc, virtual, în tot cursul ciclului celular, fiind întreruptă doar o scurtă perioadă de timp în momentul diviziunii celulare. Tehnica este aplicabilă numai asupra microorganismelor care pot fi recunoscute prin microscopie și la care viteza de creștere și de încorporare a markerului radioactiv pot fi determinate independent (Atlas și Bartha, 1987).

### Microautoradiografia

Tehnica detectează *in situ* capacitatea microorganismelor de a îngloba anumiți nutrienți marcați radioactiv și de a-i încorpora în macromolecule.

După Brock și Brock (1964), are avantajul de a furniza date privind viabilitatea, creșterea și multiplicarea bacteriilor și permite stabilirea pre-

zenței și localizarea markerului radioactiv în celulă. Alegerea substratului marcat depinde de problemele ecologice specifice studiate. Pentru autotrofe este preferat [$^{14}CO_2$], iar pentru heterotrofe, opțiunea este arbitrară între [$^{14}C$ glucoză], [$^{3}H$ aminoacizi] și [$^{3}H$ glucoză]. [$^{14}CO_2$] este folosit, în special, în studiile de oceanografie și limnologie asupra productivității primare (fixarea fotosintetică a [$^{14}CO_2$] de către alge).

Metoda se bazează pe relația stoichiometrică dintre asimilarea $CO_2$ și sintezele celulare: pentru fiecare mol de $CO_2$ utilizat este sintetizat un mol de compuși organici reduși.

[$^{14}C$] este furnizat sub formă de Na bicarbonic radioactiv ($NaH^{14}CO_3$). Preparatele, menținute în prezența substratului radioactiv, sînt apoi conservate prin fixare și acoperite cu o emulsie fotosensibilă. După developare cu substanțe chimice uzuale din tehnica fotografică se urmărește prezența granulațiilor fine de Ag metalic vizibile la microscopul fotonic. Sînt înregistrate ca metabolic active celulele bacteriene care conțin agregate de 3—5 granulații. Unii autori consideră că acest criteriu subestimează realitatea. Tehnica permite calcularea procentului de celule active raportat la numărul total de microorganisme. După Atlas și Bartha (1987), în diferitele medii naturale, bacteriile metabolic active ar reprezenta între 3 și 55% din numărul total.

Testul este extrem de sensibil, avînd capacitatea de a detecta $^{14}CO_2$ în concentrație de micromoli. El poate fi aplicat și altor medii ca, de exemplu, solul, suprafața rădăcinii plantelor etc.

Utilizarea ca marker a timidinei tritiate, ca precursor al ADN, evidențiază celulele care se multiplică și încorporează substanța radioactivă în cursul sintezei ADN.

Automicroradiografia are următoarele avantaje:

1) oferă posibilitatea studierii directe a microorigansmelor *in situ*, în mediile naturale, cu perturbări minime ale situației lor;

2) evidențiază modificările induse de variațiile mediului (temperatură, pH etc.), de ciclurile sezoniere, precum și de diferiți factori biochimici (nutrienți, stimulatori, toxice).

3) metoda poate fi adaptată pentru a urmări efectele pesticidelor și ale altor substanțe introduse în mediu.

Tehnica are și unele limitări decurgînd din faptul că rezultatele sînt dependente: de durata expunerii optime, relativ greu de stabilit, la acțiunea substratului radioactiv, de viteza de încorporare (la rîndul ei dependentă de intensitatea activității metabolice), de activitatea specifică externă a izotopului etc.

## Producția primară de materie organică

În funcție de natura microorganismelor și a mediului, producția primară totală se poate realiza și studia prin măsurarea trei procese:

1) *Fotosinteza oxigenică*, reducerea $CO_2$ la $[CH_2O]_n$, proces dependent de lumină și însoțit de eliberarea concomitentă a $O_2$ caracteristic plantelor verzi, algelor și cianobacteriilor.

2) *Fotosinteza anoxigenică*, proprie bacteriilor fotosintetizante purpurii și verzi, avînd loc fără eliberare de $O_2$.

3) *Producția chemolitotrofă*, reducerea la întuneric a $CO_2$ la $[CH_2O]_n$ pe seama substratelor anorganice reduse din mediu. Chemolitotrofia convențională (bazată pe oxidarea $S^{2-}$, $NH_4^+$, $H_2$ sau $Fe^{2+}$), foarte răspîndită în natură este considerată din punct de vedere termodinamic ca producție secundară, deoarece substratele necesare pentru evoluția reacțiilor respective sînt derivate din descompunerea materiei organice, care a fost produsă originar prin fotosinteză. Oricum, indiferent dacă este considerată ca producție primară sau secundară, activitatea chemolitotrofă convențională reprezintă o sursă extrem de importantă de C redus, în anumite rețele trofice localizate. *Stricto sensu*, numai chemolitotrofia din jurul izvoarelor hidrotermale, realizată de bacteriile ultratermofile și barofile, care folosesc energia geotermală, poate fi etichetată ca realizînd o producție primară (Karl, 1984, 1986).

În cercetările de ecologia microorganismelor, determinările producției primare au la bază urmărirea producerii de C organic prin încorporarea $^{14}CO_2$, iar în cazul fotosintezei oxigenice măsurarea eliberării de $O_2$.

## Determinarea potențialului de oxidoreducere al mediului

ZoBell (1946), precum și Genovese și Rigano (1964) au demonstrat că măsurarea potențialului redox (Eh) efectuat *in situ*, în diferite medii natu-

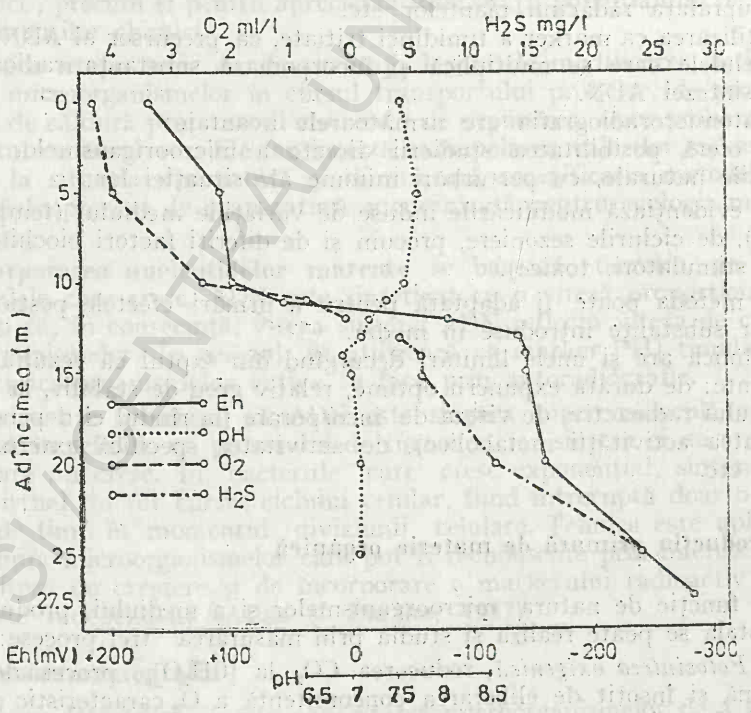



Fig. 78. — Corelațiile dintre potențialul redox (Eh) și caracteristicile fizicochimice (pH, $O_2$ și $H_2S$) ale apei unui lac. Concentrația $H_2S$ este mică în coloana de apă cu Eh ridicat (zona aerobă) și crește progresiv în zona cu Eh mic (anaerobă) (după Genevese și Rigano, 1964).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY

rale (lacuri și mări, sedimente neconsolidate, apa din sol etc.), furnizează date semnificative privind condițiile generale fizico-chimice ale mediilor respective.

Potențialul redox exprimă gradul de oxidare sau de reducere al sistemelor oxidoreducătoare, la care se pot raporta din punct de vedere electrochimic cea mai mare parte din mediile naturale.

Prezența $O_2$ și a substratelor oxidante, ca și sărăcia în substanțe organice în curs de descompunere sînt exprimate în valori pozitive ale acestui indice.

Condițiile reducătoare, exprimate în valori negative ale Eh, sînt determinate de prezența unor compuși organici, a Fe feros, a Mn redus, a $H_2S$ și a unor compuși anorganici.

Figura 78, bazată pe determinări efectuate la diferitele adîncimi într-un lac din Italia, demonstrează că valorile pozitive maxime ale Eh sînt întîlnite la suprafața și în regiunile în care concentrația $O_2$ este încă mare. Pe măsură ce adîncimea crește, cantitatea $O_2$ scade și paralel diminuă valorile Eh. În stratul de tranziție, locul $O_2$ este luat de cantități crescînde de $H_2S$, iar Eh are valori crescînd negative. Cele mai mari concentrații de $H_2S$ și cele mai mari valori negative ale Eh sînt întîlnite la fundul lacului (Genovese și Rigano, 1964).

Spre deosebire de pH, care are o mai mare stabilitate, în așa fel încît determinările pot fi făcute după transportarea probelor la laborator, potențialul redox poate varia în timp foarte scurt. De aici, nevoia de a-l determina *în situ*. Datele furnizate sînt utile în cercetarea ecologică, deoarece furnizează primele indicații privind natura fizico-chimică a mediului și procesele biologice care se desfășoară în el.

## RELEVANȚA DATELOR DE LABORATOR PENTRU REALITĂȚILE DIN NATURĂ

**„Studiile sistemelor definite pot fi de ajutor, dar nu vor putea spune niciodată ceea ce se întîmplă, în realitate, în sistemele naturale complexe"**

L. R. POMEROY

Deși observarea microorganismelor în mediile naturale datează încă de la începuturile microbiologiei ca știință (van Leeuwenhoek, 1677), studiul microorganismelor în natură reprezintă, după Karl (1986), unul din domeniile cel mai puțin dezvoltate ale acesteia.

Numărul microorganismelor, biomasa și activitatea metabolică reprezintă cei trei parametri fundamentali a căror cunoaștere este esențială pentru înțelegerea rolului lor în ecosistem. În anumite condiții, ei pot prezenta o anumită corelație pozitivă, alteori nu. De aceea este necesară o precauție deosebită cînd un parametru este dedus prin calcul, respectiv prin conversia altuia.

Simpla determinare a numărului microorganismelor dintr-un habitat este nesemnificativă din punct de vedere ecologic. În aprecierea rezultatelor trebuie ținut seama de faptul că limita de detectare prin microscopie directă este, cel puțin pentru unele medii, de $10^6$ bacterii/ml, respectiv este situată la cea mai mică limită de densitate populațională la care bacteriile au un anumit rol într-un ecosistem. Pe acest criteriu se poate considera că bacteriile care „ nu se văd" într-un anumit mediu nu pot avea o anumită activitate în el (Brock, 1971). În realitate, în cazul ecosistemelor relativ stabile, prelungind durata observației s-au putut demonstra anumite activități chiar la concentrații mai mici. Relația dintre numărul microorganismelor și biomasă trebuie abordată cu mare precauție. Ea are oarecare valoare în cazul microorganismelor unicelulare ale căror dimensiuni variază în limite restrînse, nu însă și în cazul celor filamentoase (actinomicete, alge, fungi), la care în cadrul aceleiași specii dimensiunile și biomasa pot varia de la 1 la 1 000. Numărul microorganismelor rămîne un indicator important privind dispersarea în natură și genetica populațiilor.

Întrucît proprietățile populațiilor de microorganisme sînt greu de studiat *in situ*, în condițiile naturale, se recurge frecvent la izolare, cultivare *in vitro*, examinarea comportamentului în laborator.

Or, spre deosebire de organismele superioare care au o capacitate limitată de adaptabilitate, încetînd să funcționeze dacă mediul suferă modificări ce depășesc anumite limite (t°, pH, concentrație nutrienți și săruri etc.) microorganismele se acomodează cu mare ușurință la condiții noi, foarte diferite fără modificări perceptibile în viteza lor de creștere.

Capacitatea mare de modulare a activităților fiziologice explică ușurința cu care microorganismele pot să se dezvolte în condiții foarte îndepărtate de cele din mediul lor natural ca, de exemplu, în condiții de culturi discontinui, continui etc.

Fenomenele de creștere atît de bine cuantificate în studiile de laborator și reglabile, pentru a asigura fie o producere maximă de biomasă, fie o sinteză maximă de metaboliți în minimum de timp, sînt greu de extrapolat la mediile naturale în care intervin numeroase constrîngeri. În plus, factorii de mediu caracteristici condițiilor naturale sînt atît de diferiți de cei din laborator, chiar într-un mod pe care nu-l putem percepe, încît crearea de modele de laborator în care ar putea fi reproduse condițiile complexe din natură, pentru a face experimentele relevante, este, în prezent, practic imposibilă. Diferitele dispozitive de laborator utilizate pentru studiul creșterii și activității microorganismelor (termostat, gradostat, chemostat, coloană de perfuzie etc.) permit experiențe interesante, dar creează doar iluzia că reproduc studiul microorganismelor în natură.

În aceste condiții trebuie ținut seama de faptul că comportamentul microorganismelor în condiții de laborator nu este obligatoriu identic cu cel din natură, în așa fel încît există riscul de a evidenția activități și procese care nu au nici o legătură cu cele desfășurate în mediile naturale.

Activitatea microorganismelor se corelează cu numărul și cu biomasa lor numai atît timp cît condițiile de mediu rămîn constante. Modificarea unor parametri ai mediului (t°, concentrația nutrienților, pH etc.) poate modifica activitatea microorganismelor, fără schimbări obligatorii ale numărului sau ale biomasei lor. În plus, activitatea microorganismelor se confruntă cu diferite tipuri de interacțiuni de la cele benefice pînă la cele nocive (antagonism, parazitism, prădare etc.).

Oricum, determinările de biomasă și de activitate, stabilirea capacității de a face sinteza unor substanțe cu proprietăți biologice unice sau de a răspunde la activitatea acestora reprezintă indicatori cu valoare superioară determinărilor numerice.

Conform celor expuse, este evident că tehnicile actuale de studiu al microorganismelor în condiții naturale sînt improprii și, comparativ cu cele din microbiologia generală, mai relative și mai puțin riguroase. Complexitatea ecosistemelor naturale și a populațiilor de microorganisme rezidente depășește posibilitățile tehnice și analitice actuale. Dificultățile, nesiguranța și limitările lor au, după Karl (1986), un caracter descurajant. Soluția este, după Brock (1971), ca într-o anumită fază a studiului, cercetătorul să se întoarcă la Natură și să studieze comportarea populațiilor de microorganisme în habitatul lor natural. La modul ideal este nevoie de o deplasare din natură în laborator și înapoi, mai mult decît frecventă, comparînd observațiile din natură cu studiul din laborator și invers.

În concluzie, pentru o interpretare cît mai corectă a rezultatelor obținute trebuie ținut seama de următoarele date:

1) Nici unul din procedeele de cuantificare a prezenței, biomasei sau activității microorganismelor în ecosistemele naturale nu are o valoare absolută.

2) Determinările sînt făcute prin examinarea unei probe din mediu, în condiții controlate în laborator, deci, din punct de vedere ecologic, asupra unui mediu similar, dar nu identic cu cel care stă la baza studiului, datorită modificărilor care intervin în urma recoltării, transportului, amestecului, prelucrării probelor etc. De aceea, extrapolarea rezultatelor la ansamblul ecosistemului trebuie făcută cu mare prudență.

3) Rareori, rezultatele obținute prin diferite metode sînt direct comparabile. De aceea, este necesar ca totdeauna să se utilizeze mai multe măsurători complementare, pe un număr cît mai mare de probe, pentru a deduce cît mai aproape de realitate rolul microorganismelor în mediul natural studiat.

4) Determinările trebuie efectuate cît mai curînd după recoltare pentru a minimaliza apariția abaterilor de la normal.

Deși este evident că tehnicile utilizate pînă în prezent nu sînt nici atît de potrivite și nici atît de exacte după cum am dori, faptul că, în mare, ele tind să se confirme unele pe altele sugerează, după Floodgate (1980), că prezintă o oarecare semnificație ecologică.

## MODELAREA ÎN ECOLOGIA MICROORGANISMELOR

„Modelele sînt instrumente, nu probe. Datoria cercetătorului este de a le testa și nu de a-și asuma „adevărul" lor"

G. D. Bowen
A. D. Rovira

Înțelegerea modului de acțiune a diferitelor forțe și principii care guvernează funcționarea ecosistemelor este condiționată, datorită complexității acestora, de efectuarea unor simplificări și de aplicarea unor considerații teoretice.

Datorită fluctuației factorilor naturali de mediu care au loc frecvent în ecosisteme acest obiectiv este greu de atins fără examinarea subsistemelor componente și fără studiul interrelațiilor dintre subsisteme.

**Modelele experimentale** permit o definire a condițiilor de mediu și a populațiilor biologice, precum și o simplificare a interacțiunilor dintre populațiile de microorganisme, ca și dintre acestea și mediu (Pielou, 1977; Hall și Day, 1977; Atlas și Bartha, 1987). Ele au dezavantajul major de a fi cu mult prea diferite de condițiile de mediu, de complexitatea și marea variabilitate a factorilor naturali, proprii unor ecosisteme. Chiar cele mai sofisticate modele experimentale sînt departe de complexitatea mediilor naturale.

În consecință, rezultatele obținute pe această cale nu pot fi extrapolate decît cu mare dificultate și cu maximă prudență la lumea naturală.

**Culturile asinerone** au fost folosite încă din primele studii deoarece au la bază tehnicile de laborator cele mai comune în microbiologie.

Ele corespund „sistemelor închise" de cultivare („Batch-culture", engl. Batch = șarjă, lot), în care un anumit volum de mediu este inoculat, spre exemplu, cu o populație de bacterii aparținînd aceleiași specii. Sistemul, corespunzînd celui mai simplu caz de gnotobioză este fundamental diferit de condițiile naturale, în care, cu excepția unor medii extreme populațiile monospecifice sînt extrem de rare. Creșterea în culturi asincrone este limitată la un volum fix de mediu, care nu este reînoit și care de cele mai multe ori este modificat progresiv în sensul diminuării concentrației nutrienților și al acumulării de produși de metabolism care pot deveni nefavorabili pentru creștere.

Deși pe această cale pot fi modificați o serie de parametri biotici sau abiotici (temperatură, pH, Eh, intensitatea iluminării în cazul microorganismelor fototrofe etc.), condițiile generale sînt foarte diferite de cele naturale prin:

1) prezența unei populații monospecifice;

2) bogăția în nutrienți a mediilor de cultură utilizate în studiile de laborator și caracterul lor artificial în raport cu condițiile din natură;

3) lipsa interacțiunilor caracteristice mediilor naturale.

În aceste condiții, numărul bacteriilor variază continuu, ritmul de creștere este impus de compoziția chimică a mediului, care variază de la un moment la altul. Vîrsta organismelor individuale este variabilă, iar numărul de generații posibile este limitat, deoarece, final, cele mai multe microorganisme mor.

Modelul experimental bazat pe tehnica „sistemelor închise" (culturile asincrone) a fost utilizat cu succes pentru stabilirea condițiilor optime de mediu în care un anumit microorganism degradează un substrat specific (spre exemplu, degradarea celulozei, pectinei etc.).

Sistemele de tip chemostat* sînt sisteme de cultivare deschise, care asigură dezvoltarea microorganismelor în flux continuu. Ele permit adăugarea cu o rată definită și constantă a anumitor cantități de mediu de cultură nou, proaspăt, în timp ce se recoltează, cu o rată egală, mediu de cultură în care s-au dezvoltat microorganismele.

Sistemul, din multe puncte de vedere fundamental diferit de mediile naturale are avantajul că poate face dintr-un anumit nutrient (sursă de C,

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 375.

N, factor de creștere etc.) un factor limitant pentru creștere, în timp ce alți nutrienți sînt în exces.

Adăugarea continuă de mediu proaspăt are avantajul de a fixa concentrația substratului și rata de creștere la o anumită valoare predeterminată, corespunzînd, de regulă, unei valori submaximale. Această situație se realizează prin menținerea unei concentrații limitante fixe a unui nutrient esențial, ajustată la un nivel inferior celui care asigură creșterea maximă într-o cultură în sistem închis. În cazurile în care rata de diluție cu mediu proaspăt este menținută constantă, concentrația tuturor componenților din mediu devine constantă și se stabilește o creștere echilibrată („Balanced growth" sau „Steady state growth"), care poate fi menținută, teoretic, indefinit.

Cînd condițiile sînt păstrate constante, sistemul chemostat permite controlul densității populațiilor de microorganisme,ît și rata specifică de creștere prin intermediul a doi factori de reglare: 1) rata diluției și 2) concentrația factorului limitant.

Sistemele de tip chemostat pot fi utilizate pentru cultivarea unor asociații gnotobiotice, respectiv a unor comunități pluripopulaționale de microorganisme.

Cu ajutorul lor au fost elucidate unele particularități ale interacțiunilor competitive și în mod particular al celor de prădătorism. S-a demonstrat, între altele, că succesul populațiilor de bacterii care competiționează pentru același substrat depinde de viteza lor maximă specifică de creștere și de concentrația substratului.

La concentrații mici de substrat o populație „x" poate competiționa cu succes cu altă populație „y" asociată, în timp ce la concentrații mari rezultatele pot fi diferite (Veldkamp și colab., 1984).

Această particularitate se explică prin faptul că în condițiile respective, unele populații pot avea viteze specifice de creștere mai mari decît altele.

Studiile de acest gen au demonstrat că diversitatea comunităților de microorganisme poate fi explicată, în parte, în funcție de selecția produsă de concentrația anumitor substraturi. Ele explică și fluctuațiile populaționale determinate de faptul că în anumite perioade, populațiile avantajate de anumite condiții, au un succes mai mare și se multiplică mai intens.

**Sistemele de tip „microcosmos"**, imaginate pentru studiul interacțiunilor mai complexe, conțin o serie de habitate multiple și implică participarea unei varietăți de populații de microorganisme, precum și a unor plante și animale.

Aceste sisteme s-au dovedit utile în studiul interrelațiilor din mediile acvatice (la interfața apă/sediment, apă/plante etc.), din sol (interfața rizoplan/rizosferă/microorganisme) și în cazul animalelor axenice sau gnotobiotice.

Modele experimentale de acest tip complex au fost adaptate pentru studiul lanțurilor trofice și mai frecvent pentru studiul biodegradabilității și bioacumulării pesticidelor. Pe această cale s-a demonstrat că administrarea DDT în sol este urmată de introducerea parțială a acestuia în lanțul trofic. Studiile de teren au confirmat acest fenomen, ca și acumularea DDT nedegradat, la concentrații de $10^5$—$10^6$ ori mai mari în organismele situate la nivelul trofic cel mai înalt.

**Modelele matematice,** dovedite ca foarte utile în diferite domenii ale Ecologiei pentru înțelegerea funcționării ecosistemelor, încearcă să exprime rezultatele obținute prin relații matematice.

Recomandate de mai mulți autori (Patten, 1971; Pielou, 1977; Shoemaker, 1977), ele permit testarea ipotezelor referitoare la funcția microorganismelor în ecosistem. Utilizînd expresii matematice (ecuații lineare și diferențiale), modelele matematice au făcut posibilă exprimarea interrelațiilor dintre microorganisme, ca și dintre microorganisme și mediul înconjurător. Ele permit, de asemenea, construcția unor diagrame sugestive.

În mod particular, cu ajutorul acestor modele au fost obținute expresii matematice demonstrate ca valabile, privind creșterea populațiilor de microorganisme și evoluția interacțiunilor competitive, în special a celor de prădătorism (Whittaker, 1975).

Deși modelarea matematică s-a dovedit o sursă importantă de verificare a studiilor de Ecologia microorganismelor, în prezent nu sînt folosite cu frecvență și nu i se acordă importanța recunoscută în studiile efectuate pe plante și animale. Ea este încă o preocupare neatractivă pentru microbiologi, acomodați cu performanțele studiilor riguros controlate în condiții experimentale de laborator.

În concluzie, este evident că modelele experimentale și matematice reprezintă un instrument important pentru înțelegerea funcției ecosistemelor și a factorilor care controlează fluxul de materie și energie în ecosistem. În plus, ele au o capacitate predictivă, utilă în special în controlul patogenilor, depozitarea și îndepărtarea substanțelor reziduale, amenajarea ecosistemelor. Prin înțelegerea funcționării globale a ecosistemelor este posibilă prognozarea consecințelor unor perturbări în orice parte a lor (Atlas și Bartha, 1987).

Este probabil că, în viitor, datorită demonstrării rolului fundamental al microorganismelor în ecologie, cu creșterea interesului societății pentru problemele de mediu și paralel cu evoluția Ecologiei microorganismelor ca știință, modelarea experimentală și cea matematică se vor apropia de nivelul de importanță și de interes cu care sînt folosite în ecologia plantelor și a animalelor.

BCU IASI / CENTRU DE CARTE

# INTERACȚIUNILE DINTRE POPULAȚIILE DE MICROORGANISME

„Interacțiunile dintre populațiile de microorganisme reprezintă una din forțele motrice ale evoluției structurii comunităților lor"

R. M. Atlas
R. Bartha

„Orice biolog care gîndește asupra obiectului său de studiu știe că nici o ființă nu este de sine stătătoare, că n-ar putea exista sau că n-ar fi ceea ce este, dacă n-ar fi parte a lumii naturale.

Ființele vii sînt ființe reale, dar realitatea lor constă în interrelațiile lor cu restul naturii și nu numai în ele însele"

W. K. Brooks

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# INTERACȚIUNILE DINTRE POPULAȚIILE DE MICROORGANISME

**„Terminologia referitoare la interacțiunile dintre microorganisme este redundantă și confuză. Termenii sînt aleși uzual pe faptul că populația este avantajată, prejudiciată sau neafectată de interacțiune, dar adesea această decizie este în funcție de opinia sau de natura interesului cercetătorului. Ceea ce vedem noi și ceea ce „vede" microorganismul pot fi două lucruri diferite. Nu cred că criteriile rigide sînt utile și chiar posibile. Important este să înțelegem ceea ce se întîmplă în populație".**

T. D. BROCK

Cu excepția notabilă a mediilor extreme, majoritatea habitatelor naturale sînt rar populate de o singură specie de microorganisme. În funcție de natura și de particularitățile lor specifice, cel mai adesea conțin un număr variabil de microorganisme diferite.

Starr și Chattergee (1972) au propus o clasificare a interacțiunilor dintre microorganisme, considerată de ei ca universal aplicabilă, bazată pe trei criterii fundamentale:

1) Pe baza localizării și a modului de existență, în raport cu altele: *comensalism*, *simbioză*, *parazitism* și *prădare*.

2) În funcție de rezultatul asocierii, respectiv indiferent (0), benefic (+) sau dăunător (—): *neutralism*, *mutualism* și *antagonism*.

3) Pe baza gradului de dependență, respectiv în funcție de caracterul *accidental*, *facultativ* sau *obligatoriu* al asociației.

Din această enumerare rezultă că unele interacțiuni sînt *pozitive* (comensalismul, protocooperarea și mutualismul) sau *negative* (competiția și amensalismul); unele sînt benefice pentru un partener și dăunătoare pentru celălalt (parazitismul și prădarea) și, în sfîrșit, altele sînt de indiferență (neutralismul).

Odum (1971) sintetizează în tabelul nr. 17, la modul global, aceste interacțiuni sub forma a nouă tipuri diferite de interacțiune.

Este probabil că în comunitățile biologice complexe funcționează cele mai multe sau chiar toate aceste tipuri de interacțiuni între diferitele populații. În acest cadru, interacțiunile pozitive măresc șansele de dezvoltare sau măcar de supraviețuire ale populațiilor beneficiare. Interacțiunile negative, care inhibă dezvoltarea populațiilor sensibile, acționează, adesea, ca mecanisme de autoreglare numerică. Ca urmare, ele pot avea un efect benefic din punct de vedere ecologic deoarece împiedică suprapopularea habitatului, fenomenele de perturbare profundă a acestuia, iar, în cazuri extreme, chiar extincția unor specii.

*Tabelul nr.17*

**Interacțiunile posibile între populațiile a două specii de microorganisme**
(adaptat după Odum, 1971)

| Tipul de interacțiune | Specia | | Natura generală a interacțiunii |
|---|---|---|---|
| | A | B | |
| Neutralism | 0 | 0 | Nici o populație nu o afectează pe cea asociată |
| Comensalism | + | 0 | Populația (A) comensală beneficiază, cea asociată (B) este neafectată. |
| Protocooperare | + | + | Interacțiune neobligatorie, bilateral benefică. |
| Mutualism | + | + | Interacțiune obligatorie, bilateral benefică. |
| Competiție prin interferență directă | − | − | Fiecare din cele două specii o poate inhiba direct pe cealaltă. |
| Competiție prin utilizarea nutrienților | − | − | Fiecare populație o poate afecta pe cealaltă, prin consumarea unui nutrient puțin abundent. |
| Amensalism | − | 0 | Una din populații (A) este inhibată, cealaltă (B) este neafectată. |
| Parazitism | + | − | Populația A cu dimensiuni, în general, mai mici parazitează populația-gazdă B. |
| Prădare | + | − | Populația prădătoare A atacă populația-gazdă B. |

În practica ecologiei microorganismelor, limitele dintre unele interacțiuni nu sînt atît de nete și ușor de aplicat în unele aspecte de nuanță, fapt care explică încadrarea diferită a unor exemple și caracterizarea lor variată de către autori diferiți.

Relațiile pot fi specifice cînd implică un anumit grad de selectivitate, în sensul că un anumit microorganism participă ca un component mai mult sau mai puțin critic al mediului partenerului său. Gradul cel mai înalt de specificitate este propriu asocierilor intracelulare, în care cei doi parteneri formează, într-un anumit sens fizic, o entitate în care acțiunea unui organism afectează direct și imediat mediul celuilalt. Cele mai multe asociații naturale de acest tip sînt obligatorii.

O interacțiune mai puțin specifică corespunde situației în care un organism este complet în afara celuilalt sau pătrunde în acesta cu ajutorul unor structuri specializate (haustori) sau rămîne extracitoplasmatic (*Bdellovibrio*).

În sfîrșit, în asocierile complet extracelulare, lipsite de contact direct, nespecifice, și frecvent accidentale, influențele se exercită prin intermediul metaboliților produși de una sau de ambele specii.

## Neutralismul

Asociere lipsită de influențe reciproce, neutralismul este considerat de mulți cercetători ca o interacțiune puțin probabilă în natură sau, în orice caz, cu o importanță minimă. Este favorizat, în general, de condițiile de mediu care nu permit creșterea activă a microorganismelor.

Teoretic s-ar putea realiza în mai multe situații distincte:

1) cînd densitatea populațiilor este mai mică și/sau activitatea lor metabolică este slabă;

2) în cazul microorganismelor foarte diferite sub raportul exigențelor lor nutritive, deci cînd nu competiționează pentru nevoi comune sau pentru aceiași nutrienți limitanți, respectiv cînd nici unul nu poate modifica condițiile necesare celuilalt;

3) în cazul populațiilor de microorganisme distanțate spațial ca, de exemplu, în habitatele marine și în lacurile oligotrofe;

4) în cazul microorganismelor separate fizic în sol sau în sedimente;

5) în cazul sporilor și al altor forme de latență;

6) în cazul microorganismelor aflate în afara habitatului lor natural (spre exemplu, microorganismele din atmosferă în care densitatea lor este foarte mică și sînt în majoritatea lor alohtone);

7) în cazul microorganismelor separate printr-o matrice de gheață, ca, de exemplu, în ghețurile polare, apa de lac dulce, produse alimentare conservate prin înghețare etc. (Atlas și Bartha, 1987).

Greu de evidențiat în mediile naturale, neutralismul poate fi evidențiat *in vitro*, în cazul unor microorganisme care cresc asociat cu viteze de multiplicare și densități finale egale cu cele cu care se dezvoltă separat.

## INTERACȚIUNI POZITIVE

Interacțiunile pozitive sînt relații de tip cooperant, care măresc viteza de creștere a organismelor asociate. Predomină la densități mici populaționale și cînd viteza de creștere este sub limitele optime.

Interacțiunile pozitive se pot produce chiar între celulele aceleiași specii. Spre exemplu, formarea coloniilor bacteriene asigură nu numai agregarea organismelor individuale, ci și o mai eficientă utilizare a resurselor disponibile. Uneori, ca la *Dictyostelium discoideum*, îmbracă forme specifice care asigură căutarea cooperantă a resurselor de nutrienți din habitat.

Interacțiunile pozitive sînt deosebit de importante în natură unde asigură degradarea substanțelor recalcitrante (lignină, hidrocarburi, produși de sinteză etc.) sau producerea de metaboliți care solubilizează diferiți compuși din habitat, făcîndu-i disponibili pentru alte microorganisme. În ecosistemele organizate spațial, gradul de cuplare dintre organismele cooperante depinde de concentrația și gradientele de difuzie a substanțelor dizolvate (nutrienți, metaboliți etc.).

Formarea coloniilor de microorganisme este probabil o adaptare bazată pe interacțiuni cooperante în populație. Producerea de enzime extracelulare de unii membri ai coloniilor face substratele disponibile pentru toți membrii populației. La densități populaționale mici, produșii solubili eliberați de aceste enzime ar fi pierduți rapid prin diluție, în timp ce la densități mari (ca în colonii), produșii rezultați sînt utilizați cu mare eficiență. Chiar microorganismele mobile, care au posibilitatea de a se îndepărta unele de altele, rămîn în colonii. Între altele, microcoloniile aderă mai ușor de particulele de nutrienți, utilizînd mai eficient resursele disponibile. Coloniile mobile conferă probabil un avantaj prin posibilitatea de a căuta noi resurse de nutrienți.

Interacțiunile cooperante au o deosebită importanță ecologică deoarece în anumite condiții pot fi creatoare de nou, ducînd în situații extreme la apariția unor organisme noi (cum este cazul lichenilor), capabile să ocupe nișe specifice, inaccesibile fiecărui organism component în parte.

În comunitățile stabilizate, care au atins sau se apropie de stadiul de climax, interacțiunile pozitive par să fie mult mai dezvoltate decît în cele noi. Invadatorii acestor comunități sînt mai ușor eliminați sau represați prin reacții severe negative declanșate de interacțiunile microorganismelor autohtone.

## COMENSALISMUL

Comensalismul sau metabioza este caracterizat prin creșterea asociată a două specii de microorganisme aflate într-o relație în care una profită de asociere, iar cealaltă, în aparență, nici nu profită, nici nu este influențată negativ. El are drept rezultat dezvoltarea unui microorganism grație prezenței concomitente în același mediu a unui microorganism aparținînd altei specii. Relația este ubicvitară, adesea întîmplătoare și lipsită de specificitate.

Există două categorii de microorganisme comensale:

1) **Ectocomensali** (epibionți) situați pe suprafața altor microorganisme, plante sau animale. Relația este favorizată, în unele cazuri, de prezența unor structuri specializate de legare (fimbrii la foarte multe bacterii, structurile de tip „crampon" („Holdfast") la *Caulobacter* pentru legarea de cianobacterii sau de diatomeele acvatice, pentru a-și obține nutrienții.

2) **Endocomensalii** prezenți în tubul digestiv la animale.

Comensalismul se poate realiza prin mai multe modalități:

1) **Modificarea fizică a mediului** pentru a-l face favorabil pentru dezvoltarea microorganismului comensal. Un exemplu tipic este cel al levurilor osmofile, care se dezvoltă în soluții concentrate de zaharoză (folosite pentru conservarea fructelor) pe care le degradează, reducîndu-le osmomolaritatea suficient pentru a permite dezvoltarea microorganismelor mai puțin osmotolerante. În mod asemănător, dezvoltarea levurilor, împiedicată de structura fructelor normale, este favorizată de atacul precursor al mucegaiurilor.

2) **Modificarea mediului pentru a-l face favorabil pentru comensal sub raport fiziologic** este ilustrată de numeroase exemple:

a) Algele fotosintetizante produc $O_2$ și ridică potențialul redox (Eh) al mediului, favorizînd dezvoltarea microorganismelor aerobe.

b) Invers, microorganismele aerobe și facultativ anaerobe diminuă potențialul redox al mediului, creînd condiții favorabile pentru anaerobii stricți, care se pot astfel dezvolta în medii ca apele reziduale, rănile profunde, țesuturile infectate etc. Un exemplu caracteristic este cel al gangrenei gazoase în care bacteriile contaminante creează condițiile necesare pentru dezvoltarea agenților patogeni specifici (*Welchia perfringens*, *Clostridium novyi* (*C. oedematiens*), *C. septicum* etc.).

3) **Sinteza unui nutrient sau unui factor de creștere esențiali pentru comensal.** Majoritatea transformărilor caracteristice ciclurilor biogeochimice ale diferitelor elemente (C, N, S, P etc.) implică producerea, de către anumite microorganisme, a unor substanțe care sînt folosite de altele: bacteriile care oxidează nitriții la nitrați (*Nitrobacter*, *Nitrocystis* etc.) nu se pot dezvolta în sol decît datorită prezenței simultane a bacteriilor (*Nitro-*

*somonas, Nitrosocystis* etc.), care oxidează $NH_3$ la nitriți și care le furnizează substratul azotat absolut necesar pentru creștere.

În mod asemănător, în fermentația alcoolică a sucului de fructe de către levuri rezultă alcool etilic ce se acumulează și servește ca metabolit esențial pentru bacteriile din genul *Acetobacter*, care îl transformă la acid acetic.

În sfîrșit, un alt exemplu este furnizat de bacteria *Flavobacterium brevis*, care sintetizează cisteina, eliminînd excesul în mediul acvatic de unde este preluată de *Legionella pneumophila*.

4) **Sinteza unor produși sau producerea unor modificări care induc sau stimulează procese morfogenetice** ce apar lent în culturi axenice (monospecifice): *Pseudomonas* sp. stimulează formarea de zoosporangi și scade producerea de chlamidospori la *Phytophtora cinnamoni* (Baker, 1980).

Reducerea concentrației nutrienților, epuizarea $O_2$, acumularea unor inhibitori de creștere sau substanțe inductoare ale morfogenezei favorizează sporogeneza la *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., levuri sau dezvoltarea miceliului aerian la *Streptomyces*.

5) **Degradarea sau neutralizarea unui factor care inhibă creșterea comensalului.** Fenomenul este ilustrat de numeroase exemple:

a) unele bacterii și mucegaiuri oxidează fenolii sau acidul benzoic, creînd condiții pentru dezvoltarea altor microorganisme;

b) bacteriile sulfuroase fotosintetizante oxidează $H_2S$, permițînd creșterea speciilor pentru care acesta este toxic;

c) *Geotrichum candidum* oxidează acidul lactic, permițînd dezvoltarea bacteriilor lactice, care în absența acestuia sînt inhibate de concentrații de acid lactic $>1\%$.

6) **Conversia unor compuși insolubili în forme solubile sau a unor compuși solubili în compuși gazoși** accesibili altor populații.

Mecanismul este întîlnit în mediile naturale în situații multiple ca, de exemplu:

a) Unii fungi care produc enzime extracelulare degradează celuloza sau lignina la compuși mai simpli, care sînt preluați de alte microorganisme ce nu produc celulaze;

b) Metanul produs în sedimentele acvatice este preluat de bacteriile metan oxidante situate în coloana de apă supraiacentă.

Comensalismul este o relație relativ *laxă* și fortuită, în sensul că microorganismele comensale nu au parteneri unici și specifici, ci, mai degrabă, asociați capabili să elaboreze un metabolit sau să inducă unele modificări ce le pot asigura existența. Avantajul dobîndit de comensal poate fi favorizant din punctul de vedere ecologic și al selecției naturale, asigurîndu-i o mare dezvoltare. Pe plan general, microorganismele autotrofe au rol metabiotic pentru heterotrofe.

## PROTOCOOPERAREA

Descrisă de Alexander (1971) ca o relație de mutualism neobligatoriu, protocooperarea este un tip de interacțiune între două microorganisme în care fiecare partener este ajutat de celălalt și fiecare reprezintă un component critic al mediului imediat al celuilalt. Relația este nespecifică, în sensul că orice specie care poate efectua procesul care stă la baza participării unuia dintre reactanți se poate substitui partenerului anterior.

În prezent, cadrul conceptului este destul de vag și explică faptul că prezintă interferențe cu sinergismul, cu sintrofia și, în unele cazuri, chiar cu mutualismul. Acest fapt este reflectat de exemplele de protocooperare care sînt încadrate în lucrările de specialitate în categorii foarte diferite.

Un exemplu ar fi reprezentat de sistemul cianobacterii și bacteriile heterotrofe prezente în teaca gelatinoasă a acestora. Cianobacteriile fotoautotrofe asimilează $CO_2$ și eliberează substanțele organice. Heterotrofele de pe suprafața lor utilizează aceste substanțe organice și eliberează factorii de creștere necesari fototrofelor. Acest mecanism, căruia i se adaugă evident și particularitățile mediului fizic, explică persistența bacteriilor heterotrofe asociate cianobacteriilor și dificultățile de a obține și de a menține culturi de cianobacterii axenice. Chiar după obținerea lor în stare pură, cu mare dificultate, cianobacteriile sînt repede reinfectate de bacterii asociate din mediul extern.

Un alt exemplu este reprezentat de *Azotobacter* sp. care fixează $N_2$ atmosferic utilizînd substanțe anorganice simple. Alte bacterii prezente în mediile naturale convertesc substanțele organice inaccesibile pentru *Azotobacter* la compuși simpli asimilabili.

## SINERGISMUL

Este o formă de protocooperare corespunzînd situației în care două sau mai multe tipuri de microorganisme prezente în același mediu pot avea activități foarte diferite, cantitativ sau calitativ, de activitățile însumate ale acelorași microorganisme cultivate separat în mediul respectiv. Este, deci, o relație de tip cooperant în cadrul căreia speciile asociate au un efect pe care fiecare în parte nu l-ar putea realiza (respectiv să facă sinteza unui produs sau să degradeze un substrat complex). Asociația nu este obligatorie în sensul că unul dintre membrii populației poate fi înlocuit de altul și că — frecvent — cele două organisme sînt capabile să se dezvolte separat în mediul lor natural.

Ca și în alte cazuri, relația este greu de diferențiat de mutualism și de comensalism și este descrisă, frecvent, de unii autori, sub alte denumiri (ca, de exemplu, cea de sintrofism).

Sinergismul este întîlnit frecvent în natură, în situații dintre cele mai diferite.

1) Unul din primele exemple a fost furnizat de Gale (1940) în cazul asocierii dintre *Escherichia coli* și *Streptococcus faecalis*. Cele două bacterii nu pot produce putrescina de la arginină decît dacă sînt cultivate asociat (fig. 79A) și niciodată izolat.

Separat, *E. coli* folosește arginina cu producere de agmatină. În asociere *S. faecalis*, utilizează arginina cu producere de ornitină, care este decarboxilată de *E. coli* la putrescină. După ce s-a format, putrescina este folosită de ambele bacterii. Interacțiunea este importantă din punct de vedere teoretic și practic deoarece are loc la nivelul sistemului digestiv al celor mai multe animale la care putrescina are efecte farmacologice semnificative după trecerea în sîngele acestora. Interacțiunea este descrisă de Brock (1966) ca mutualism, iar de alți autori ca sintrofism.

2) Acțiunea sinergică poate asigura sinteza unor compuși organici cu structură mai complexă. Astfel, separat, bacteriile *Pseudomonas aureofaciens* var. *nonliquefaciens* și *P. fluorescens* nu au activitate lecitinazică. Cultivate

asociat, produc cantități mari de lecitinază. Este probabil că, în fapt, cele două specii produc anumite substanțe difuzibile, inactive ca atare, dar capabile de asamblare în afara celulelor pentru a forma un complex enzimatic activ (Bates, 1963).

3) Degradarea „cooperantă" a unor substanțe organice complexe cum sînt, în general, materialele de origine vegetală (celuloza, lignina etc.). Sînt degradate în natură fie mai ușor, fie obligatoriu de comunitățile de microorganisme diferite.

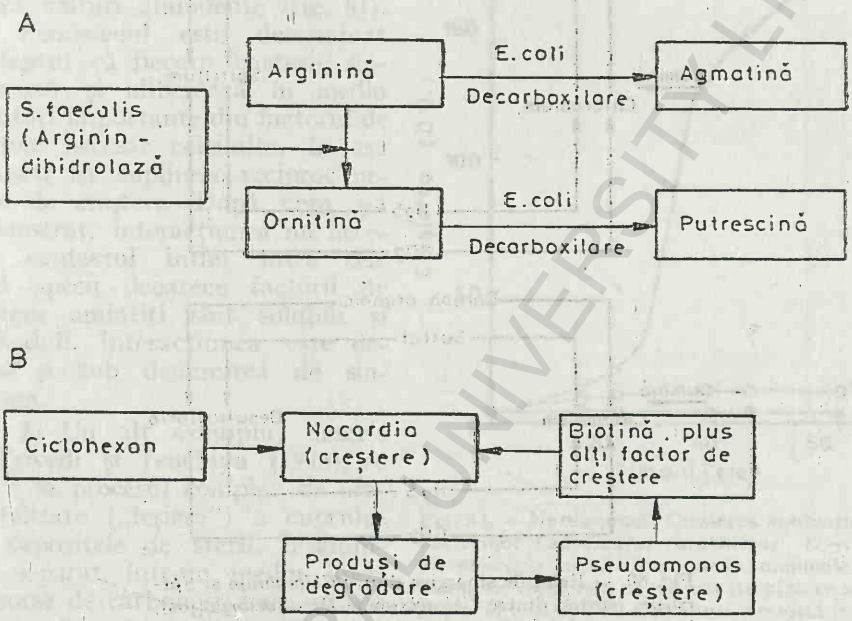



Fig. 79. — **A.** Relația sinergică dintre bacteriile *Streptococcus faecalis* și *Escherichia coli* în producerea putrescinei de la arginină. **B.** Degradarea sinergică a ciclohexanului de asociația *Nocardia* sp. — *Pseudomonas* sp. *Nocardia* furnizează produșii de degradare ai ciclohexanului, iar *Pseudomonas*, biotină și alți factori de creștere.

4) Slater (1978) a descris capacitatea bacteriilor *Nocardia* și *Pseudomonas* de a degrada, cînd sînt asociate, substanța organică de sinteză ciclohexan pe care nu o pot folosi individual (fig. 79 B).

Studiul biochimic al relației a demonstrat că *Nocardia* utilizează ciclohexanul cu producerea unor compuși intermediari necesari pentru creșterea bacteriilor din genul *Pseudomonas*. La rîndul lor, acestea produc o serie de factori de creștere (în special, biotină) utilizată de *Nocardia* pentru creștere.

5) Arndt și Ritsi (1961) citează influența interacțiunilor sinergice asupră unor tulpini slab virulente sau chiar complet inofensive: două tulpini avirulente de *Staphylococcus aureus*, complet inofensive pentru șoarece, omoară 9 din 15 și respectiv 13 din 15 animale dacă sînt asociate cu *Proteus vulgaris*.

6) Wolfe și Pfenning (1977) citează două exemple de sinergism într-un sistem alcătuit dintr-o bacterie fototrofă și una heterotrofă. În prezența unor

surse de $H_2S$ și $CO_2$, *Chlorobium* sp. produce formiat (materie organică și sulf elementar), realizînd, în același timp, detoxifierea mediului care ar putea deveni inaccesibil vieții prin acumulare de $H_2S$. *Spirillum* sp. utilizează $S^0$ și formiat pentru a produce $H_2S$ și $CO_2$, care sînt necesari bacteriei fotosintetizante (fig. 80).

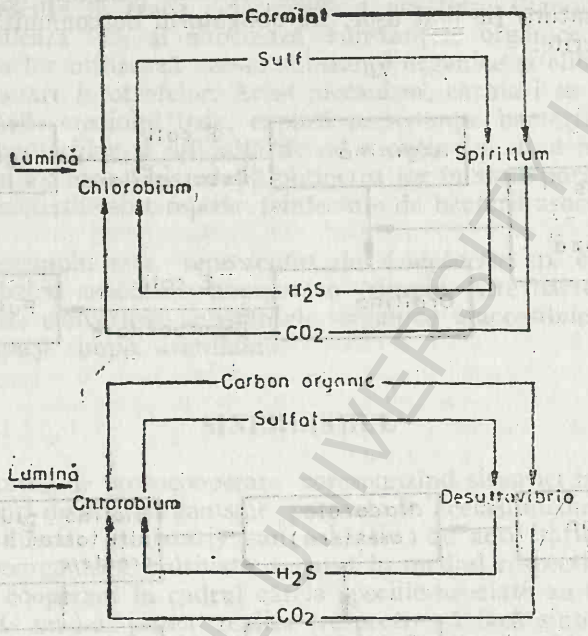



Fig. 80. — Relațiile sinergice dintre *Chlorobium* și *Spirillum* (sus) și dintre *Chlorobium* și *Desulfovibrio* (jos), bazate pe circulația carbonului și a sulfului. *Chlorobium* reduce $CO_2$ și oxidează $H_2S$; *Desulfovibrio* și *Spirillum* oxidează C organic și reduc sulful la $H_2S$ (după Wolfe și Pfenning, 1977).

În sistemul *Chlorobium* sp./*Desulfovibrio* sp., bacteria fototrofă produce C organic și sulfat preluați de *Desulfovibrio*, care produce $H_2S$ și $CO_2$. Și în acest sistem se realizează cuplată funcția de îndepărtare a excesului de $H_2S$ cu rol important antitoxic.

## MUTUALISMUL

Asociație bilateral benefică, mutualismul este o relație care prezintă diferite grade, de la asocieri laxe pînă la forme obligatorii între microorganisme sau între microorganisme și plante sau animale.

Considerat de Atlas și Bartha (1987) ca o extindere a sinergismului, mutualismul implică:

1) apropierea fizică strînsă a partenerilor;

2) un grad important de specificitate a interacțiunii și decurgînd din aceasta;

3) caracterul obligatoriu, reflectat prin imposibilitatea înlocuirii unui membru al asociației de către specii înrudite.

Au fost observate mai multe exemple de mutualism:

1) Nurmikko (1956) a descris cazul bacteriilor *Lactobacillus arabinosus* 17—5 (necesită pentru creștere fenilalanină) și *Streptococcus faecalis* R (necesită acid folic), care nu se pot dezvolta separat pe un mediu minimal, în timp ce cultivate asociat formează culturi abundente (fig. 81).

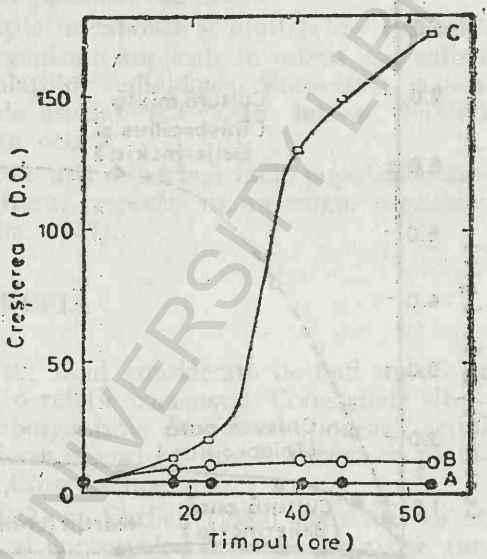



Fig. 81. — Mutualismul. Creșterea simbiotică a bacteriilor *Lactobacillus arabinosus* 17—5 și *Streptococcus faecalis* R pe medii minimale. A. Curba de creștere a *S. faecalis* (tulpină ce necesită acid folic). B. *L. arabinosus* (necesită fenilalanină). C. Creștere asociată. D.O.= unități densitate optică (după Nurmikko, 1956).

Fenomenul este determinat de faptul că fiecare bacterie sintetizează și eliberează în mediu cantități importante din factorul de creștere necesar celeilalte, în așa fel încît își suplinesc reciproc nevoile de creștere. După cum s-a demonstrat, interacțiunea nu necesită contactul intim între cele două specii deoarece factorii de creștere amintiți sînt solubili și dializabili. Interacțiunea este descrisă și sub denumirea de sintrofism.

2) Un alt exemplu, descris de Trivedi și Tsuchiya (1975), se referă la procesul complex de biosolubilizare („leșiere") a cuprului din depozitele de steril. Însămînțate separat, într-un mediu lipsit de surse de carbon și azot, căruia i s-a adăugat un concentrat de steril, cele două tulpini sînt ineficiente: cantitatea de Cu solubilizat prin acțiunea culturii pure de *T. ferrooxidans* este infimă. Prin contrast, cultura mixtă *(Thiobacillus ferrooxidans* și *Beijerinckia lacticogenes)* este foarte eficientă (fig. 82).

Figura 83 reprezintă interacțiunile mutuale posibile în acest proces, realizabile într-un mediu lipsit de C și N, în care *B. lacticogenes* acționează ca fixator de $N_2$ atmosferic, iar *T. ferrooxidans* ca fixator de $CO_2$.

Relațiile mutuale par să fie foarte frecvente în natură, în special în asocierile dintre bacterii și alge în mediul marin. Bacteriile produc vitamina $B_{12}$ necesară algelor, iar aceasta furnizează bacteriilor asociate $O_2$ și fotosintat.

Brock (1966) citează cazul asociațiilor mutuale descrise în cazul oxidării apelor reziduale deversate în lagune, ca și cel al dispozitivelor experimentale de schimbători de gaze produse inițial pentru vehiculele spațiale. În aceste sisteme, algele utilizează lumina și produc compuși organici și $O_2$ necesar pentru metabolismul bacteriilor heterotrofe aerobe. Bacteriile, uneori epifite pe suprafața algelor, mineralizează compușii organici la $CO_2$ și produc factori de creștere necesari algelor. Se remarcă faptul că deși biomasa bacte-

riană reprezintă numai 1—5%, sistemul este foarte activ datorită asocierii intime dintre bacterii și alge și transferului eficient de $O_2$ de la alge la celulele bacteriene.

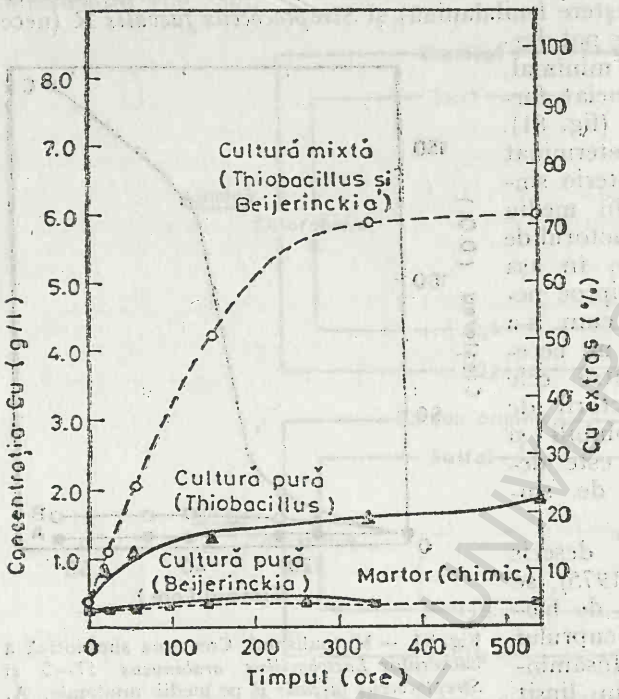



Fig. 82. — Mutualism în cursul solubilizării (lesierii) cuprului. În condiții controlate de mediu, culturile mixte (*Thiobacillus* + *Beijerinckia*) solubilizează cantități mai mari decît culturile pure (după Trivedi și Tsuchiya, 1975).

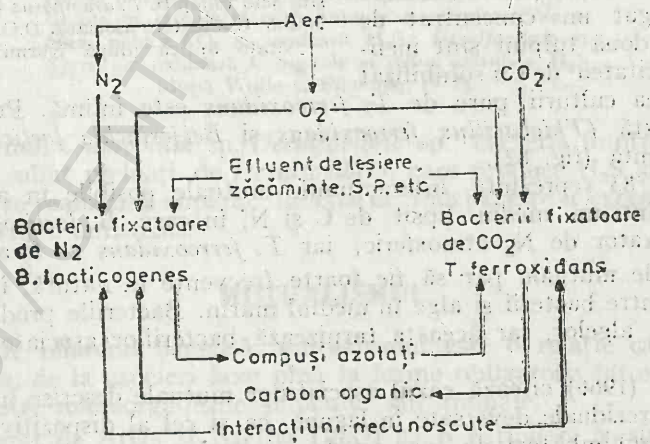



Fig. 83. — Mutualism în cursul solubilizării metalelor în efluenții de lesiere și zăcăminte. Interacțiunile dintre două specii bacteriene (*Beijerinckia lacticogenes* și *Thiobacillus ferrooxidans*) favorizează solubilizarea într-un mediu lipsit de carbon fixat și de azot fixat (după Trivedi și Tsuchiya, 1975).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Atlas și Bartha (1987) citează cazul asocierii cu caracter mutual dintre fungii endofiți aparținînd speciei *Acremonium coenophialum* și planta furajeră *Festuca arundinacea*. Ea ar fi apărut în cursul evoluției pentru a proteja plantele de insectele fitofage și de erbivorele mari. În acest sistem, fungii, care beneficiază de protecție și de nutrienți, sintetizează un produs repelent pentru afide și care produce tulburări de nutriție animalelor, diminuînd astfel riscul unui consum excesiv al plantelor amintite.

**Semnificație ecologică.** Activitățile metabolice și limitele de toleranță fiziologică ale populațiilor de microorganisme implicate în relații mutualiste sînt foarte diferite de cele ale populațiilor individuale. Consecința majoră decurge din faptul că microorganismele asociate pot exista într-un habitat pe care, fiecare în parte, nu-l poate ocupa.

În cazurile extreme, asocierea este atît de strînsă încît populațiile asociate se comportă ca o populație unitară, respectiv ca un singur organism, cu o identitate unică (Atlas și Bartha, 1987).

## SINTROFIA

Este o relație ambiguu definită, fiind considerată de unii autori ca o formă de sinergism, iar de alții ca o relație comensală. Corespunde situației în care unul sau mai multe microorganisme care interacționează acționează ca o sursă de metaboliți majori sau minori pe care îi împart cu partenerii lor într-un schimb metabolic („Cross-feeding").

Wimpenny (1982), Bochen (1982) și Ehrlich (1985) consideră ca un caz tipic de asociație sintrofică cel al consorțiilor de microorganisme, care formează un agregat, cu o organizare definită în care cei doi sau mai mulți parteneri strîns asociați fizic depind unul de celălalt pentru creștere. El este ilustrat de „bacteria" *Methanobacillus omelianskii* descrisă de Bayant și colab. (1967) și considerată inițial ca dezvoltîndu-se în culturi pure.

În realitate, ea reprezintă o asociere simbiotică a două specii bacteriene distincte „S" și „H" care ilustrează forma cea mai strîns cuplată de metabolism cooperant:

Bacteria „S" oxidează etanolul la acetat și $H_2$, dar în condiții de echilibru reacția este incapabilă să producă energia necesară pentru creștere.

Bacteria „H" metanogenă utilizează în cultură asociată hidrogenul produs de „S" pentru a realiza oxidarea etanolului cu producere de metan, eliberînd de la acetat și $H_2$ o cantitate importantă de energie necesară pentru creștere. Reacțiile globale sînt următoarele:

**Bacteria „S"**
(Monocultură)

$$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$$
$$\Delta G^\circ = +9{,}6 \text{ kj mol}$$
(la 1 atm $H_2$)

**Bacteria „S" + Bacteria „H"**
(Co-cultură)

$$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4$$
$$CH_3COO^- + H^+ + 2H_2 \quad \uparrow \quad + \quad H_2O$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -35{,}9 \text{ kj mol}$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -130{,}8 \text{ kj mol}$$
(la $10^{-3}$ atm $H_2$)

Un alt exemplu de sintrofism este reprezentat de consorțiile de microorganisme strîns agregate care formează „grăunțele conopidiforme" ce participă la fermentația laptelui, la Kefir. Ele conțin *Streptococcus lactis, S. cremoris, Leuconostoc dextranicus, Bacillus kefir* și levuri.

Ehrlich (1985) consideră sintrofia ca stînd la baza unor relații mutuale prezente în unele medii naturale foarte heterogene.

El citează cazul mediilor anaerobe foarte diverse (sedimente de ape dulci și marine, rumen etc.) în care au loc fenomene de transfer interspecific de $H_2$.

La nivelul lor, un grup de organisme sau o ierarhie de două sau mai multe grupe de bacterii fermentează glucidele sau alte surse organice de energie, producînd $H_2$, $CO_2$, acizi volatili și alți metaboliți. Alte bacterii anaerobe care utilizează $H_2$ (ca de exemplu bacteriile metanogene, acetogene, sulfat reducătoare etc.) reduc $CO_2$ la metan, acetat și respectiv sulfatul sau sulful elementar la $H_2S$. În acest mediu, bacteriile producătoare de $H_2$ nu pot continua fermentația dacă hidrogenul produs de ele nu este „consumat" de alte bacterii asociate sintrofic.

Unii cercetători includ în categoria relațiilor sintrofice o asociere importantă pentru patologia umană, deși interacțiunile sînt încă vag și unilateral definite. Ei se bazează pe observația că lichidele de cultură ale unor cianobacterii *(Nostoc, Fischerella, Synechocystis, Phormidium)*, ca și ale unor alge verzi *(Chlorella, Scenedesmus, Chlamydomonas)* asigură creșterea și multiplicarea bacteriei *Legionella pneumophila*. Fenomenul ar explica persistența acestei bacterii în bazinele de apă dulce și în apele turnurilor de răcire ale centralelor termoelectrice.

### Producerea de substanțe probiotice

Sub această denumire, Jacobson și Beroza (1965) au descris o serie de substanțe produse de *Colpidium campylum*, avînd efect stimulator asupra creșterii la *Paramecium caudatum*.

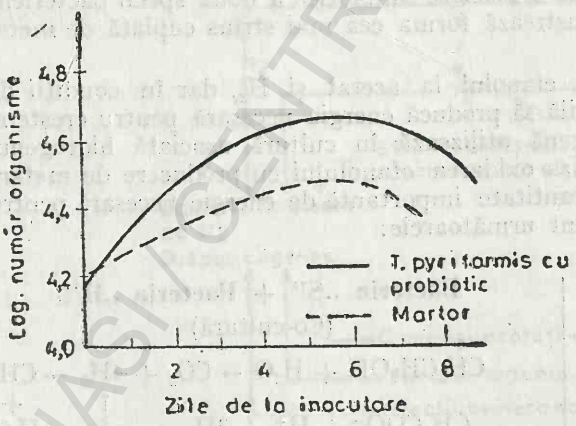



Fig. 84. — Reprezentarea schematică a efectului stimulator al substanțelor probiotice produse de *Colpidium campylum* asupra creșterii unei tulpini de *Tetrahymena pyriformis* (——), comparativ cu creșterea martorului (— — —) (după Jacobson și Beroza, 1965).

Substanțele probiotice, a căror compoziție chimică nu a fost încă stabilită, sînt produse de mai multe specii de protozoare în cursul fazei logaritmice de creștere și au capacitatea de a prelungi faza respectivă a altor specii asociate (fig. 84). Acest efect este de ~ 50% la *Tetrahymena pyriformis*.

Mecanismul de acțiune este necunoscut. Fenomenul pare să fie răspîndit și, în unele cazuri, bazat pe reciprocitate. Astfel, *Tetrahymena* stimulează *Stylonychia*, iar aceasta stimulează *Paramecium* și invers.

## INTERACȚIUNI NEGATIVE

Interacțiunile negative sînt prezente în special la densități mari de microorganisme și afectează viteza de creștere a uneia dintre populații (fig. 85). Ele includ:

1) competiția pentru un substrat disponibil;

2) producerea de compuși toxici de către una din populații cu efect nociv pentru alta;

3) acumularea de metaboliți cu rol inhibitor pentru alte specii (acizi organici, $H_2S$);

4) parazitism sau prădare.

Limitînd densitatea populațiilor de microorganisme, interacțiunile negative acționează ca mecanisme de autoreglare, care pe termen lung sînt benefice, împiedicînd suprapopulația, distrugerea habitatului și extincția speciei.

În ansamblu, interacțiunile pozitive și negative mențin echilibrul ecologic al comunităților de microorganisme.

### COMPETIȚIA

**„Probabil că nicăeiri în lumea vie, competiția nu este mai aprigă decît între microorganisme".**

T. D. Brock

Interacțiune cu importanță fundamentală pentru toate organismele în natură, și probabil cea mai importantă ca mecanism selectiv, competiția decurge din diversitatea microorganismelor care populează un anumit habitat și din faptul că dezvoltarea lor depinde, în ultimă instanță, de aceleași substanțe chimice esențiale.

Conceptul de competiție este destul de vag și este definit de Clark 1966) drept efectul negativ al unui organism asupra altuia, ca rezultat al utilizării sau consumării unei resurse din mediu (sursă de C, N, P, factori de creștere etc.).

Unii cercetători extind acest concept de la nutrienți la spațiu, lumină, aer etc., respectiv la orice tip de interacțiune între două sau mai multe specii, în cursul căreia creșterea și supraviețuirea uneia este afectată. Cele mai multe exemple demonstrează caracterul esențial al competiției în raport cu un substrat adecvat care limitează creșterea sau cu o sursă de energie, întrucît foarte multe habitate ca, de exemplu, cele din sol nu sînt niciodată spații fizic ocupate. De altfel, după Gause (1934), competiția totală nu poate exista deoarece în natură două specii diferite nu pot ocupa o nișă ecologică absolut identică.

Competiția este observată frecvent în cazul a două microorganisme stabilite în același habitat, care au nevoie de aceiași nutrienți, iar aceștia sînt în cantități prea mici pentru a-i satisface pe amîndoi. În general, cel mai bine adaptat predomină sau îi elimină pe ceilalți.

Competiția este observată frecvent *in vitro* pe plăcile Petri: coloniile foarte apropiate care competiționează pentru spațiu și nutrienții sînt mici; cele îndepărtate sînt mult mai mari. De aceea, în culturile mixte nu se

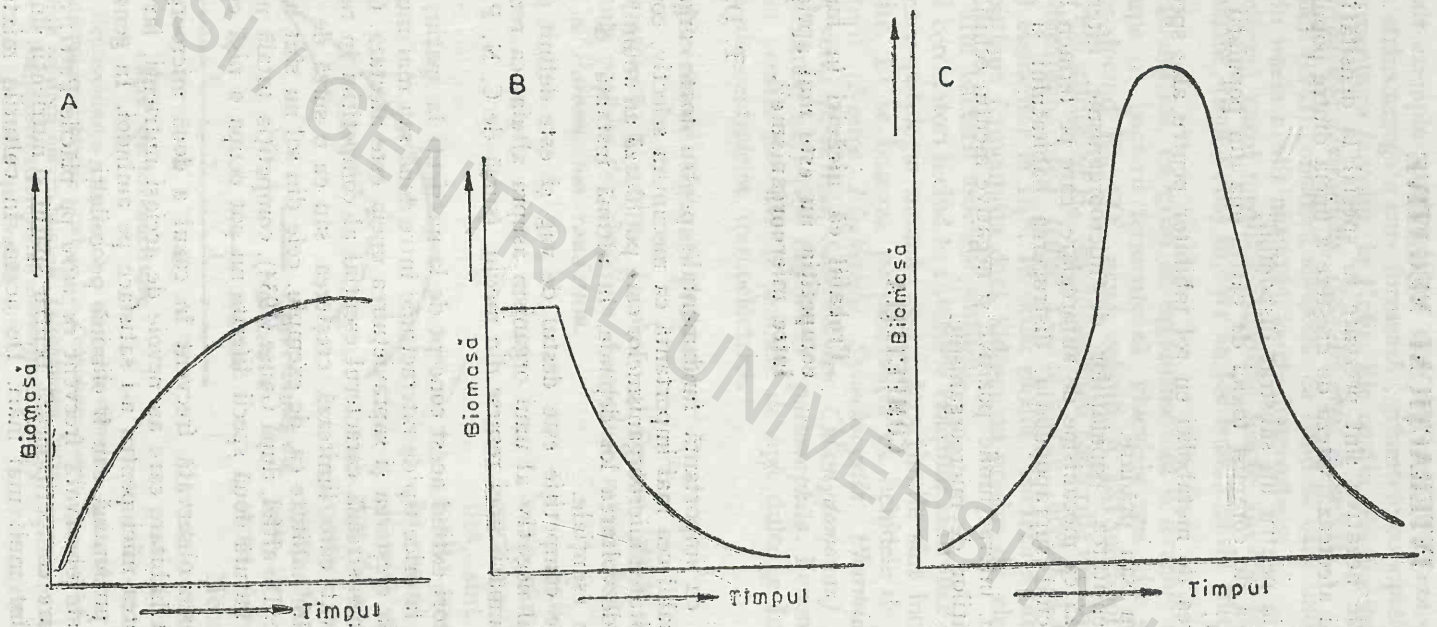



Fig. 85. — Efectele independente ale interacțiunilor pozitive (A) și negative (B) asupra ratei de creștere a unor populații de microorganisme. C. Efectul combinat al interacțiunilor pozitive și negative într-o populație de microorganisme. La densități populaționale mici predomină interacțiunile pozitive, la cele mari domină interacțiunile negative. Între aceste limite există o zonă în care rata de creștere asigură o densitate populațională optimă (după Atlas și Bartha, 1987).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ajunge niciodată la densitatea maximă potențială observată în culturile monospecifice de laborator, pentru că una dintre specii consumă substanțele esențiale pentru cea de-a doua.

Au fost descrise două tipuri de competiție:

1) **Competiția interspecifică** — respectiv interacțiunea dintre două sau mai multe specii care afectează advers creșterea uneia dintre ele. Ea explică moartea microorganismelor străine în sol sau în ape, în competiția cu microorganisme autohtone, mai bine adaptate la mediul respectiv.

2) **Competiția intraspecifică** — între tulpini ale aceleiași specii ca, de exemplu, creșterea mai intensă a bacteriilor patogene virulente în culturi, în competiție cu mutantele avirulente. De asemenea, predominarea tulpinilor sensibile la antibiotice față de cele rezistente, în absența antibioticului din mediu.

Spre deosebire de antagonism, parazitism și prădare, în competiție influențele adverse se realizează indirect, prin luptă bilaterală pentru satisfacerea unor necesități comune.

Powell (1958) a efectuat un studiu fundamental al competiției în chemostat între o populație bacteriană și un organism contaminant, în condiții de limitare a unui nutrient unic. Prelucrarea matematică a datelor demonstrează că în absența oricăror alte interacțiuni, evoluția competiției depinde, în principiu, numai de relația dintre viteza specifică de creștere și de concentrația substratului.

Fenomenul a fost confirmat inițial de Gause (1934), în sistemul *Paramecium caudatum*/*P. aurelia*, care în culturi mixte se multiplică o perioadă de timp, după care, datorită competiției, numărul celulelor de *P. caudatum* începe să scadă progresiv pentru a dispărea, practic, complet după ~ 16 zile. Ritmul diviziunii puțin mai mare al *P. aurelia* îi conferă un avantaj în competiția pentru o cantitate limitată de hrană (fig. 7).

Un fenomen asemănător a fost demonstrat și în sistemul *Escherichia coli*/*Staphylococcus aureus*. Figura 86 prezintă curbele de creștere practic identice în culturi monospecifice, precum și efectul cultivării

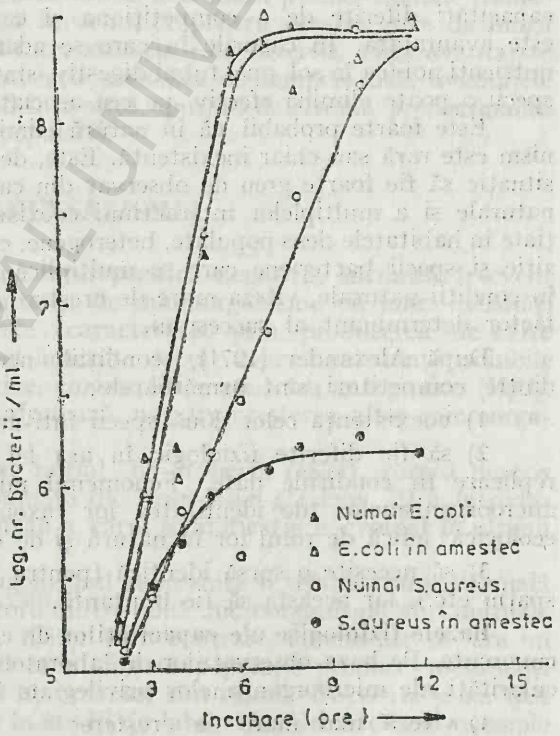



Fig. 86. — Competiția dintre *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În cultură mixtă, *E. coli*, care are un timp de generație mai mic, se multiplică mai rapid, consumă nutrienții și limitează creșterea *S. aureus* (după Oberhofer și Frazier, 1961).

lor asociate. Se observă diminuarea netă a numărului *S. aureus*, deoarece *E coli*, care se multiplică mai rapid, epuizează nutrienții necesari pentru creșterea speciei asociate.

Alexander (1971) descrie acest fenomen sub denumirea de *deplasare* sau *excludere* competitivă („Competitive displacement" sau „Competitive exclusion"). El se bazează pe observația că populațiile a două organisme deosebite, care ocupă aceeași nișă și au viteze de creștere diferite nu pot coexista timp îndelungat. Cea care se multiplică mai repede în condițiile date o elimină sau determină dispariția celei ce se multiplică mai lent. După cum evidențiază figura 86, competiția nu acționează la densități mici de populație în mediile de cultură bogate în nutrienți. Cele două specii se multiplică inițial asociat, la fel ca în culturile axenice, consumînd nutrienții din mediu pînă la un moment critic, cînd concentrația unora dintre ei devine insuficientă pentru a asigura rate maxime de creștere pentru cele două populații diferite. Cererea depășește posibilitatea de aprovizionare și fiecare dintre cei doi competitori suferă într-un anumit grad de deficitul de factor limitant.

Cînd capacitățile competitive nu sînt foarte diferite se observă un efect dăunător bilateral (densitatea ambelor specii devine mai mică). De regulă însă, cum este și cazul ilustrat în figura 86, cele două populații au capacități diferite de a competiționa și cea care se multiplică mai rapid este avantajată. În cazurile în care se adaugă constant, în mod periodic, nutrienți noi (ca în sol, ape, tubul digestiv, stațiile de epurare etc.), una dintre specii o poate elimina efectiv pe cea asociată (Pelczar, 1977).

Este foarte probabil că în natură eliminarea totală a unui microorganism este rară sau chiar inexistentă. Este, de asemenea, probabil ca această situație să fie foarte greu de observat din cauza complexității ecosistemelor naturale și a multiplelor interacțiuni coexistente. Frecvent au fost evidențiate în habitatele dens populate, heterogene, cu condiții optime pentru compoziție și specii bacteriene care se multiplică lent, ceea ce demonstrează că, în condiții naturale, viteza mare de creștere și multiplicare nu este singurul factor determinant al succesului.

După Alexander (1971), condițiile necesare pentru excluderea unuia dintre competitori sînt următoarele:

1) coexistența celor două specii într-un mediu identic;

2) să fie diferite fiziologic în așa fel încît una să fie avantajată în replicare în condițiile date. Fenomenul nu ține de poziția sistematică a microorganismelor (de identitatea lor taxonomică), ci de similaritatea lor ecologică, adică de rolul lor în natură și de exigențele lor nutritive;

3) să necesite o sursă identică (pentru biosinteze, energie, $O_2$, lumină, spațiu etc.), iar aceasta să fie limitantă.

**Bazele fiziologice ale capacităților de competiție** sînt, în general, puțin cunoscute. Pe baza observațiilor de laborator și de teren, principalele particularități ale microorganismelor privilegiate în competiție sînt următoarele:

1) viteză mai mare de creștere;

2) eficiență mare în transportul în celulă și în conversia în biomasă a nutrienților limitanți;

3) capacitate de a sintetiza și stoca substanțe de rezervă și de a le utiliza la nevoie;

4) capacitate de a-și sintetiza factorii de creștere. Prototrofele sînt avantajate față de auxotrofe;

5) toleranță la factori abiotici (lumină, t°, uscăciune etc.) și la variațiile mediului;

6) mobilitate și capacitate de a se deplasa grație diferitelor taxii spre zone mai favorabile (Alexander, 1971).

În ansamblu, factorii implicați în competiție au o importantă semnificație ecologică, deoarece acționează ca regulatori ai compoziției în specii a unei comunități de microorganisme și ai densității lor relative în habitat. De cele mai multe ori, în natură, o serie de factori atenuează severitatea competiției, determinînd coexistența competitorilor.

Evoluția competiției în condiții naturale nu este influențată numai de concentrația nutrienților, ci și de o serie de parametri abiotici ai mediului (pH, temperatură, concentrația oxigenului sau a sărurilor, toleranța la uscăciune etc.), care pot afecta viteza de creștere a populațiilor de microorganisme.

Acest fenomen este evident în cazul populațiilor de bacterii psihrofile și psihrotrofe, care, prezente asociat, competiționează pentru aceeași concentrație mică de nutrienți. La temperaturi joase sînt avantajate microorganismele psihrofile, care se multiplică cu viteze mai mari, putînd exclude psihrotrofele în cazul în care condiția favorizantă pentru acestea este de lungă durată. La temperaturi mai ridicate, situația este inversă, fiind avantajate psihrotrofele. În habitatele cu variații periodice de temperatură, avantajele evoluează cînd într-un sens, cînd într-altul, putînd determina predominanța uneia sau alteia din cele două populații.

## AMENSALISMUL

Este un tip de interacțiune interspecifică negativă, întîlnită frecvent în natură, în special în comunitatea de microorganisme cu mari densități populaționale. Amensalismul este caracterizat prin producerea de către microorganismele aparținînd unei anumite specii a unor substanțe solubile organice (acizi grași, etanol, toxine, enzime litice etc.) sau anorganice ($H_2O_2$, $NH_3$, $NO_2^-$, $H_2S$, $O_2$ etc.), care afectează negativ creșterea altor microorganisme asociate din mediu.

Fenomenul a fost observat inițial de Roberts (1874), care a descris activitatea antibacteriană determinată de *Penicilium glaucum*. El a introdus și termenul de antagonism microbian a cărui semnificație a evoluat în ultimii ani.

În concepția actuală, antagonismul reprezintă o relație competițională în care efectele toxice sau inhibitorii dintre două microorganisme sînt mutuale (Fredrickson și Stephanopoulos, 1981). Prin contrast, amensalismul are un caracter unidirecțional, în sensul că o singură populație produce metaboliți toxici sau inhibitori. Relațiile de tip amensal sînt relativ frecvente și au fost evidențiate atît în natură, cît și în studii de laborator. Următoarele exemple sînt tipice.

Producerea de acizi organici sau anorganici modifică mediul natural, făcîndu-l inaccesibil microorganismelor sensibile. Este cazul acizilor grași produși de microorganismele autohtone de pe suprafața pielii umane, care nu îngăduie colonizarea acesteia de către bacteriile patogene.

Un alt exemplu este reprezentat de producerea de $H_2SO_4$ de către bacteriile sulfoxidante *(Thiobacillus thiooxidans)*, care scade valorile pH ale apelor de drenaj din mine la 1,0—2,0. Apele respective împiedică dezvoltarea altor microorganisme în habitatul afectat și, totodată, influențează și prezența microorganismelor acidosensibile din apele curgătoare în care sînt deversate.

Producerea biogenă și acumularea de $H_2S$ în anaerobioză (în sedimentele din bălți și mări, în solurile inundate, în tancurile cu ape poluate etc.) inactivează microorganismele pentru care $H_2S$ este toxic.

*Pseudomonas* sp., produc pigmenți care inhibă germinarea sporilor de *Aspergillus* și scad producerea de clamidospori de către *Phytophtora cinammomi*.

Producerea de $H_2O_2$ de către unele specii de *Streptococcus* exercită un efect antibacterian asupra altor microorganisme din salivă. Efectul este anulat de microorganismele care produc catalază.

Producerea de $O_2$ de către *Chlorella* prin fotosinteză inhibă denitrificarea anaerobă efectuată de *Pseudomonas stutzeri*.

**Semnificație ecologică.** Amensalismul este un fenomen benefic pentru microorganismele producătoare de substanțe toxice sau cu rol inhibitor, deoarece le conferă un anumit avantaj competitiv. Populațiile de microorganisme care produc astfel de substanțe modifică habitatele naturale încît le fac inaccesibile altor microorganisme.

Împreună cu antagonismul, are o importanță ecologică deosebită deoarece determină distribuția și mărimea populațiilor de microorganisme, contribuind la structura comunităților lor.

Cele două tipuri de interacțiune diminuă viteza de creștere a populațiilor sensibile și inhibă multiplicarea lor pînă la îndepărtarea din mediu. Prin acest mecanism se reduc fenomenele de competiție interspecifică pentru nutrienți sau pentru situsuri fizice de multiplicare. De asemenea, ele favorizează colonizarea selectivă a unui habitat.

În ansamblu, acumularea produșilor cu activitate inhibitoare și fenomenele de antagonism contribuie alături de modificările calitative și cantitative ale nutrienților la apariția modificărilor în structura comunităților de microorganisme, care stau la baza succesiunii populațiilor într-un ecosistem.

Fenomenul are și unele efecte benefice ca, de exemplu, cele de eliminare a unor microorganisme patogene pentru plante, om sau animale. De asemenea, stă la baza tehnicilor de conservare a alimentelor prin acțiunea unor acizi (acetic, lactic, propionic) sau a etanolului.

## ANTIBIOZA

Este fenomenul determinat de acțiunea unor compuși chimici specifici produși sau derivați din anumite microorganisme, care în concentrații mici au un efect inhibitor sau letal asupra altor organisme.

Antibioza a fost descoperită de Roberts (1874), care a descris sub denumirea de *antagonism* efectul inhibitor exercitat de *Penicilium glaucum* asupra bacteriilor. Villemin (1889) a propus termenul de *antibiotic*, iar Fleming (1928), studiind antibioticul produs de *P. notatum*, a deschis era aplicațiilor practice.

Multe microorganisme (eubacterii, actinomicete, fungi) produc mai multe (5—6) antibiotice diferite, în proporții variabile, determinate de natura mediului de cultură și de condițiile de mediu.

În cultura de laborator, producerea de antibiotice are loc în faza logaritmică tardivă sau în faza staționară de creștere („idiofaza", după Bu Lock (1965)).

Există puține probe concrete privind producerea antibioticelor în mediile naturale și, după Shaw (1987), nu se poate afirma categoric că antibioticele ar avea un anumit rol în ecologia microorganismelor din sol. Aceasta mai ales pentru faptul că datele referitoare la producerea antibioticelor *in vitro* nu pot fi extrapolate la condițiile din sol, dar, ca și în alte cazuri, lipsa probelor referitoare la producerea și rolul antibiozei în sol nu demonstrează că acest fenomen nu are loc. Încercarea de a detecta în condiții de laborator producerea de antibiotice într-o probă de sol prin adăugarea unui număr mare de producători nu a dat rezultate pozitive. Rezultatul a fost însă pozitiv dacă solul a fost în prealabil tratat termic sau dacă i s-a încorporat un nutrient organic sub formă de făină de soia. Nutrienții adăugați sau modificările produse prin tratare termică stimulează dezvoltarea culturilor și producerea de antibiotice.

**Semnificația ecologică a producerii antibioticelor în mediile naturale.** Este probabil că în sol, cel mai adesea, microorganismele producătoare de antibiotice se găsesc în stare latentă (spori etc.). Creșterea lor vegetativă și producerea de antibiotice sînt limitate la scurte perioade cînd condițiile de mediu (apă, temperatură, nutrienți organici sub forma resturilor de țesuturi vegetale sau a substanțelor secretate în rizosferă) sînt corespunzătoare. De aceea, în sol, biogeneza antibioticelor are loc în microhabitate și este discontinuă în timp și în spațiu. În general, condițiile care măresc viteza de creștere și de reproducere a microorganismelor în sol sînt, teoretic, favorabile și pentru producerea antibioticelor, asigurînd stimularea capacității de competiție a producătorului. După formare, antibioticele sînt fie secretate, fie eliberate după autoliza și moartea celulelor producătoare.

Cantitatea de antibiotice detectate depinde de raportul dintre viteza de producere și cea de degradare. Ultima este mai rapidă în caz că solul prezintă valori de pH la care antibioticul este inactivat.

În solurile bogate și cu o diversitate mare de microorganisme, producătorul de antibiotic trebuie să competiționeze cu alți saprofiți, care, la rîndul lor, pot fi, de asemenea, producători de antibiotice în așa fel încît se pot înregistra fenomene de antagonism între antagoniști (Brian, 1954).

Antibioticele produse în sol pot fi degradate chimic sau biologic (prin acțiunea enzimelor produse de alte microorganisme) sau inactivate prin adsorbție pe argile sau humus, în așa fel încît importanța prezenței lor depinde de acești factori, care pot acționa frecvent simultan.

Deși sinteza antibioticelor în natură este discontinuă și, raportată la microorganismele individuale, nesemnificativă, ele pot avea o anumită semnificație ecologică, ținînd seama de numărul mare de microorganisme prezente în anumite microhabitate și de marea lor capacitate de multiplicare. Este evident că antibioticele cu o mai mare stabilitate intrinsecă și cu rezistență la degradare, precum și cele greu adsorbite pot avea o semnificație ecologică deosebită.

După Brian (1957), unele date pledează pentru ideea producerii antibioticelor în unele medii acvatice (lacuri, oceane etc.) în care apar asemenea produșilor metabolici secretați sau difuzați din celulele care le-au produs, modificînd mediul din jur. El consideră că antibioticele s-ar comporta asemănător substanțelor „ectocrine", descrise de Lucas (1949), care au rol de reglare extracelulară mai puțin subtil, dar funcțional asemănător celui al secrețiilor endocrine.

În realitate, fenomenul este mult mai nuanțat și deși poate fi real procesul de diluție îl reduce la limite nesemnificative. În concluzie, în timp ce antagonismul microbian, ca fenomen global, reprezintă, prin complexitatea mecanismelor sale, alături de competiție, un factor major pentru echilibrul biologic al diferitelor medii naturale (sol, microbiota intestinală, rumen etc.), semnificația ecologică a antibiozei este greu de apreciat.

Teoretic, ea reprezintă un fenomen avantajos pentru producător și dăunător microorganismelor sensibile, iar complexitatea mediilor naturale complică foarte mult interpretarea acestor fenomene: dacă ar fi așa, în natură (în special în sol) ar trebui să fie mai mulți producători de antibiotice, ceea ce nu este cazul.

**Semnificația biologică generală a antibiozei și substanțelor antibiotice.** Recent, Davies (1990) a emis ipoteza că antibioticele ar fi substanțe arhaice cu funcții moderne. Ea are la bază observația că ~ 5% din metaboliții secundari* au activitate antibiotică și apartenența necontestată a antibioticelor la această categorie de substanțe.

După Davies, metaboliții secundari, în general, au avut o serie de „funcții posibile". Ei sînt molecule foarte vechi, care au jucat un rol important încă de la începutul evoluției biochimice, acționînd ca efectori sau cofactori în efectuarea și/sau modularea reacțiilor, prin interacțiuni chimice și structurale cu situsuri „receptor" în matricele macromoleculare. În acest context, structuri de tipul antibioticelor s-au format încă de la începuturile evoluției biochimice. Ele au putut acționa în reacțiile primitive pentru a stabiliza conformațiile active sau chiar ca precursori nepeptidici ai enzimelor actuale, într-o varietate de reacții de condensare ca, de exemplu, în transcrierea și traducerea genetică. Datorită ineficienței în aceste funcții, ele au fost înlocuite, de-a lungul evoluției, cu sisteme mai perfecționate. Cu toate acestea, datorită coevoluției moleculelor mici și a interacțiunilor cu polimerii-templat, multe dintre situsurile de legare au persistat. În același timp, moleculele cu greutate moleculară mică, de tipul metaboliților secundari (inclusiv antibioticele), au păstrat capacitatea de a interacționa funcțional cu aceste situsuri, chiar în superstructurile macromoleculare moderne. Figura 87 prezintă o schemă ipotetică, evidențiind implicarea efectorilor cu greutate moleculară mică și origine primitivă în evoluția sistemului de traducere a informației genetice, cuplat cu evoluția funcției antibiotice de inhibitori ai sintezei proteinelor.

---

* Metaboliții secundari (sin. „metaboliți speciali", „specifici", idioliți sau „produși naturali") = substanțe neesențiale pentru creșterea microorganismului producător, cu compoziție chimică complexă, deși frecvent cu greutate moleculară mică, relativ exceptate de turnover, produse pe căile biosintetice în care sînt implicate. *In vitro*, în culturi lichide submerse sînt produși după încetarea creșterii microorganismului producător (în idiofază și nu înainte de aceasta (în trofofază). Se acumulează frecvent în cantități mari. Sînt greu de integrat în fiziologia generală a microorganismului producător (Cambell, 1984; Bennet și Bentley (1989).

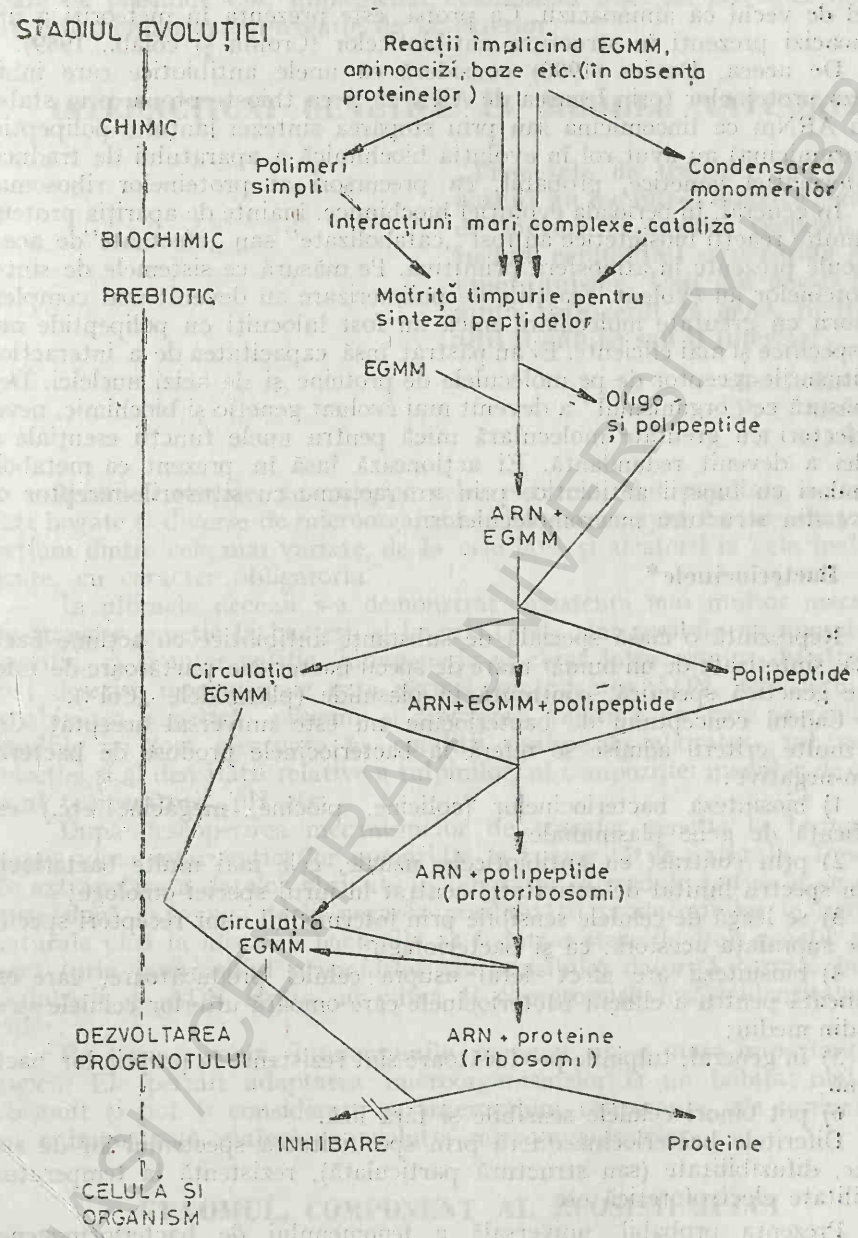



Fig. 87. — Schemă ipotetică privind implicarea efectorilor cu greutate moleculară mică (EGMM), cu origine primordială în evoluția biochimică a sistemului de traducere a informației genetice (sinteza proteinelor), cuplat cu rolul lor evolutiv de inhibitori ai acestei sinteze (după Davies, 1990).



BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Multe antibiotice sau precursorii lor înrudiți structural sînt probabil la fel de vechi ca aminoacizii. Ca probă, este prezența în meteoriți a unor aminoacizi prezenți în structura antibioticelor (Cronin și colab., 1989).

De aceea, Davies (1990) consideră că unele antibiotice care inhibă sinteza proteinelor (prin legarea de ARN 23 S ca thiostreptona, prin stabilizarea ARNm ca lincomicina sau prin stoparea sintezei lanțului polipeptidic ca puromicina) au avut rol în evoluția biochimică a aparatului de traducere a informației genetice, probabil, ca precursori ai proteinelor ribosomale.

În general, în perioada evoluției biochimice, înainte de apariția proteinelor, multe reacții biosintetice au fost „catabolizate" sau „efectuate"de aceste molecule prezente în atmosfera primitivă. Pe măsură ce sistemele de sinteză a proteinelor au evoluat, reacțiile de polimerizare au devenit mai complexe, efectorii cu greutate moleculară mică au fost înlocuiți cu polipeptide mult mai specifice și mai eficiente. Ei au păstrat însă capacitatea de a interacționa cu situsurile-receptor de pe moleculele de proteine și de acizi nucleici. Deci, pe măsură ce „organismul" a devenit mai evoluat genetic și biochimic, nevoia de efectori cu greutate moleculară mică pentru unele funcții esențiale ale celulei a devenit redundantă. Ei acționează însă în prezent ca metaboliți secundari cu funcții antibiotice prin interacțiune cu situsurile-receptor originare din structura macromoleculelor.

### Bacteriocinele*

Reprezintă o clasă specială de substanțe antibiotice cu acțiune bactericidă, sintetizate de un număr mare de specii bacteriene purtătoare de informație genetică specifică, conținută în plasmide (plasmidele „Col").

Cadrul conceptului de bacteriocine nu este universal acceptat. Cele mai multe criterii admise se referă la bacteriocinele produse de bacteriile Gram-negative:

1) biosinteza bacteriocinelor (colicine, piocine, megacine etc.) este codificată de gene plasmidiale;

2) prin contrast cu antibioticele uzuale, cele mai multe bacteriocine au un spectru limitat de activitate, centrat în jurul speciei omologe;

3) se leagă de celulele sensibile prin intermediul unor receptori specifici de pe suprafața acestora, ca și bacteriofagii;

4) biosinteza are efect letal asupra celulei producătoare, care este sacrificată pentru a elibera bacteriocinele care omoară ulterior celulele sensibile din mediu;

5) în general, tulpinile producătoare sînt rezistente la propria lor bacteriocină;

6) pot omorî celulele sensibile și fără liză.

Diferitele bacteriocine diferă prin specificitatea spectrului lor de activitate, difuzibilitate (sau structură particulată), rezistență la temperatură, mobilitate electroforetică etc.

Prezența probabil universală a fenomenului de bacteriocinogeneză în lumea bacteriilor și persistența lui de-a lungul evoluției reprezintă expresia unei semnificații biologice deosebite și, în primul rînd, un rol de reglare a dinamicii populațiilor bacteriene în diferite ecosisteme naturale. Capacitatea

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 111.

de a produce bacteriocine ar mări șansele de supraviețuire a celulelor purtătoare de plasmide Col, împiedicînd colonizarea nișei lor ecologice de către alte microorganisme provenite de la exterior.

## INTERACȚIUNI GENETICE ÎN MEDIILE NATURALE

**„Procesele de transfer de ADN în natură au loc într-o matrice complexă de factori de mediu variabili, care includ comunități structurate de microorganisme. Unii din acești factori ajută transferul de gene, în timp ce alții îl inhibă sau îl întîrzie".**

D. C. REANNEY
P. C. GOWLAND
J. H. SLATER

Mediile naturale, cu excepția celor extreme, sînt populate de comunități bogate și diverse de microorganisme, între care apar cu necesitate interacțiuni dintre cele mai variate, de la cele laxe și aleatorii la cele înalt integrate, cu caracter obligatoriu.

În ultimele decenii s-a demonstrat existența mai multor mecanisme de transfer genetic la bacterii și levuri. Unele sînt posibile nu numai intraspecific, ci și interspecific, intergeneric și chiar între regnuri diferite*. Au fost descrise mecanismele care permit mobilizarea ADN, transferul și recombinarea genetică, precum și frecvența relativă cu care se realizează. Studiile au fost efectuate în condiții optime de laborator, sub raportul selecției și al densității relative a tulpinilor, al compoziției mediilor de cultură și al temperaturii, pH etc.

După descoperirea mecanismelor de transfer genetic la bacterii s-a impus ideea intervenției lor potențiale în comunitățile naturale. Tendințele de extrapolare a datelor obținute în laborator la mediile naturale au oscilat între două extreme de la negarea posibilității producerii lor în habitatele naturale pînă la ideea că bacteriile ar fi într-o stare de flux genetic permanent (prin intermediul plasmidelor transmisibile) datorită căruia, în urma înglobării de ADN străin, ar putea fi compromisă însăși identitatea speciilor.

Pe termen scurt, interacțiunile genetice au o mare importanță ecologică. Ele permit adaptarea microorganismelor la un habitat mai puțin obișnuit și pot fi considerate ca interacțiuni cooperante. Pe termen lung, au o importanță majoră în evoluția microorganismelor.

## GENOMUL, COMPONENT AL ECOSISTEMULUI

Una din achizițiile fundamentale ale biologiei moleculare, deși de pe poziții reducționiste, este aceea că particularitățile de comportament ale oricărui organism pot fi explicate în funcție de proprietățile și structura

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 334.

moleculelor lor specifice și că, la rîndul lor, acestea sînt determinate de structura sa genetică.

Tipurile de interacțiune între materialul genetic și mediu sînt relativ puțin studiate, deși din punctul de vedere al geneticianului, ecologia reprezintă studiul relațiilor între caracterele intrinsece, genetice, ale organismului și caracterele extrinsece, ale mediului.

Existența în anumite ecosisteme a diferite categorii de microorganisme reflectă capacitatea lor de a competiționa unele cu altele și de a supraviețui și a se multiplica în mediul respectiv. În acest cadru, este bine determinat faptul că fiecare specie de microorganisme ocupă un anumit habitat numai atît timp cît este bine adaptat la condițiile acestuia. Imediat ce unele modificări fizice sau chimice (temperatură, pH, compoziția chimică și concentrația nutrienților etc.) fac condițiile de mediu mai adecvate altor specii, acestea se substituie celor mai puțin adaptate.

Figura 372 ilustrează succesiunea și modificările cantitative ale diferitelor tipuri de microorganisme într-un sistem specific, reflectînd acțiunea selectivă a mediului asupra microorganismelor cu mare diversitate genetică, metabolică și fiziologică.

Este evident că persistența și multiplicarea microorganismelor într-un anumit mediu ține, în cea mai mare măsură, de structura lor genetică, determinantă pentru adaptarea lor la mediul respectiv și care limitează, în același timp, riguros potențialul de adaptare fenotipică. Din acest punct de vedere, ecologia ar putea fi definită sintetic ca studiul fenotipurilor controlate de genom în relație cu ecosistemul în care se dezvoltă (Pelczar, 1977).

Ca și în cazul altor forme de viață, capacitatea microorganismelor de a se adapta la mediu este moștenită, dar particularitățile fenotipice, rezultînd din adaptare, pot fi moștenite sau nu. Ca atare, supraviețuirea, creșterea și multiplicarea unui microorganism într-un anumit mediu implică mecanisme atît de adaptare evolutivă, cît și de adaptare fenotipică.

**Adaptarea evolutivă** („Evolutionary adaptation") este o adaptare la variații îndelungate. Ea are la bază modificarea genotipului, prin mutații spontane sau induse, transfer de informație și recombinare genetică, și selecția tulpinilor mai bine adaptate la condițiile mediului respectiv. Un exemplu este cel al bacteriilor rezistente la antibiotice (prin mutații sau mai ales prin achiziția plasmidelor R).

**Adaptarea fenotipică sau fiziologică** este rezultatul răspunsului organismului sau al populației la modificări temporare, în limite controlate genetic (de exemplu, adaptarea lor la temperaturi ridicate este urmată de pierderea flagelilor pentru mai multe generații, după care reapar). Modificările fenotipice apar la toți indivizii populației expuse la condițiile schimbate ale mediului (Pelczar, 1977; Shepherd, 1957).

După Shepherd (1957) și Pelczat (1977), din punct de vedere ecologic există patru tipuri de interacțiuni ale genomului cu mediul natural:

1) **Genomul fix în mediu fix**, neinteresant din punct de vedere ecologic, deoarece este lipsit de interacțiuni semnificative.

2) **Genom fix în mediu variabil.** Raportat la un organism individual (exceptînd cazul apariției unei mutații), genomul este un component constant, caracterizat prin reproducere și transmiterea conservatoare a informației genetice. Ca atare, el limitează gradul și tipul de adaptare la un mediu variabil. Cu toate acestea, în cazul microorganismelor (mai mult decît în

cel al altor organisme), chiar cu un genom fix există, cel mai adesea, un grad important de plasticitate ca răspuns la modificările mediului ambiant (t°, pH, natura și concentrația nutrienților, $O_2$ etc.) la care microorganismul trebuie să se adapteze pentru a supraviețui.

În cazul genomului nemodificat, răspunsul caracteristic al individului la un mediu variabil este prin definiție adaptarea fiziologică (fenotipică). Ea este relativ rapidă, adesea greu de recunoscut și urmată de revenirea la fenotipul originar, imediat ce se restabilește mediul inițial.

Acest comportament este ilustrat de modificările fenotipice induse de variațiile de temperatură și de pH.

Astfel, s-a demonstrat că la anumite temperaturi, creșterea unor microorganisme este condiționată de adăugarea în mediu a unor factori de creștere. Spre exemplu, *Neurospora crassa* mutanta 7400, la 26°C, crește în medii fără adenină, în timp ce la 33°C necesită, neapărat, adăugarea acesteia.

În mod asemănător, variațiile de pH ale mediului extern afectează exprimarea fenotipică a unor gene: *Neurospora*, mutanta auxotrofă pentru piridoxină, este dependentă de prezența acesteia în mediu la pH 5,8, dar o sintetizează la valori mai mari de pH. S-a demonstrat, de asemenea, că la *Escherichia coli* și la *Micrococcus lysodeikticus*, unele enzime sînt sintetizate constant, indiferent de pH, în timp ce altele sînt produse numai cînd valorile de pH sînt cuprinse în limitele optime pentru creștere.

3) **Genom variabil în mediu fix.** Relația corespunde cazului în care genomul este modificat prin mutații, prin transfer de informație genetică (transformare genetică, transducție fagică etc.) sau prin heterokarioză.

Rata mutațiilor spontane (probabilitatea apariției unui anumit eveniment mutațional/per entitate biologică (celulă sau individ)/per generație) poate fi influențată de numeroși factori fizici, chimici sau genetici, caracteristici unui mediu fix. Astfel, la *Phytomonas stewartii*, rata mutațiilor care afectează forma, mărimea, suprafața și culoarea coloniilor este de 10 ori mai mare la 36°C decît la 12°C (cu valori intermediare la temperaturi intermediare).

De asemenea, prezența în mediu a unei mari diversități de produși chimici (inclusiv unii compuși naturali ca $H_2O_2$) poate afecta rata mutațiilor. Efectul mutagen al peroxidului asupra bacteriilor și conidiilor de *Neurospora* este anulat de prezența catalazei în mediu. Rata mutațiilor crește evident dacă pe lîngă catalază se adaugă inhibitori ai acesteia (cianuri, azide etc.). Chiar în absența catalazei adăugate în mediu, prezența inhibitorilor ei mărește rata mutațiilor spontane, probabil, datorită acumulării de peroxid produs de microorganisme în metabolismul lor normal.

**Heterokarioza.** Mecanism răspîndit la fungi, heterokarioza are la bază asocierea unor genomuri diferite, amplasate într-o citoplasmă unică. Celula rezultată — heterokarion — conține doi sau mai mulți nuclei, proveniți din tulpini fungice diferite, care se multiplică unul lîngă altul, într-o citoplasmă comună, afectată de ambele tipuri de informație genetică. Această structură temporară (limitată la un singur ciclu de creștere, deoarece nucleii diferiți segregă în momentul sporulării) conferă o mare plasticitate miceliului care crește. În unele cazuri, heterokarionii se disociază în cursul creșterii prin segregarea spontană a componenților nucleari.

La *Aspergillus nidulans*, heterokarioza este asociată cu fenomene de recombinare mitotică. Există, de asemenea, o mutageneză heterokariotică

în care mutabilitatea unor caractere este de o sută de mii de ori mai mare decît normal.

4) **Genom variabil în mediu natural variabil.** Din punctul de vedere al organismului individual, reacția genomului variabil într-un mediu variabil este o măsură a adaptabilității sistemului său genetic realizată prin mutații, transfer de informație genetică și recombinare genetică sau heterokarioză.

În populații care conțin genomuri diferite, variația mediului este prima cauză a schimbărilor datorate selecției: genotipul cel mai puțin apt să se acomodeze acestor condiții este pierdut sau menținut la o densitate foarte mică. Rezultatul interacțiunii îndelungate în sistemul genom variabil/mediu variabil este adaptarea evolutivă.

## TRANSFERUL DE GENE LA BACTERII ÎN NATURĂ

În ultimele decenii au fost stabilite mai multe mecanisme de transfer genetic la bacterii, unele posibile nu numai intraspecific, ci și interspecific și intergeneric *. Au fost descrise mecanismele care permit mobilizarea ADN, transferul și recombinarea genetică, precum și frecvența relativă cu care se realizează. Studiile au fost realizate în condiții de laborator sub raportul selecției și densității relative a tulpinilor, mediilor de cultură, temperatură, pH etc.

Tendințele de extrapolare a datelor obținute la mediile naturale au oscilat între două extreme: de la negarea posibilității reducerii lor în habitatele naturale pînă la ideea că bacteriile pot fi într-o stare de flux genetic permanent, datorită căreia, în urma înglobării de ADN străin, ar putea fi compromisă însăși identitatea speciilor respective.

### Probe indirecte privind achiziția de ADN în natură, în structura cromosomului bacterian

Numeroase studii genetice au demonstrat că bacteriile aparținînd unor anumite grupuri de înrudire au hărți genetice similare și că la unele dintre ele, ordinea globală a genelor cromosomale este aproape aceeași, deși ele s-au separat de strămoșii lor comuni de multe milioane de ani și și-au replicat, în acest interval, independent, genomul de cîteva miliarde de ori. Astfel, în familia *Enterobacteriaceae*, bacteriile *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* și *Klebsiella pneumoniae* au hărți genetice foarte asemănătoare. Cu toate acestea, compararea hărților genetice ale unor bacterii foarte înrudite arată că distanțele genetice dintre anumite gene nu sînt aceleași, sugerînd că, în anumite localizări, au fost adăugate sau sustrase segmente de ADN.

Riley și Krawiec (1987) citează existența a circa 15 situații de acest gen între *E. coli* și *Salmonella typhimurium*. Ele sugerează că, spre exemplu, operonul *lac* fie că a fost adăugat la *E. coli*, fie că a fost pierdut de *S. typhimurium*. Ambele mecanisme sînt, după cum s-a demonstrat experimental, perfect posibile. Astfel, inserția de gene se poate realiza prin integrarea plasmidelor, a Tn, prin adiția genelor unor fagi criptici, defectivi sau transductori etc.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 335.

Un alt exemplu este furnizat de compararea genelor ce codifică enzima β-lactamaza, care sînt identice la 70 de plasmide R, din cele ~100 demonstrate ca prezente în natură. El sugerează că genele operonului *lac* au putut „difuza" la mai multe specii, prin transfer de ADN în diferite etape ale evoluției lor.

În sfîrșit, Ambler (1980), stabilind secvența aminoacizilor în enzima β-lactamază sintetizată de diferite specii (*E. coli*, *Bacillus licheniformis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* etc.), a demonstrat că asemănările sînt atît de mari, încît sugerează fie transferul lor între diferite tulpini de-a lungul timpului, fie divergența de la o singură genă ancestrală.

În sprijinul primei ipoteze pledează o serie de experiențe de laborator, ca și unele observații efectuate în anumite medii spitalicești monitorizate, care au demonstrat transferul unei plasmide cu markeri genetici specifici de la o bacterie infectată primar la altele diferite de ea.

### Transformarea genetică în natură

Teoretic, transformarea genetică este mecanismul cel mai greu de realizat în natură deoarece necesită, pe lîngă prezența ADN intact, menținerea sa extracelulară, precum și o stare fiziologică tranzitorie a celulelor receptoare (starea de competență).

*Prezența ADN în natură.* Paradoxal, ADN bacterian este prezent în mediile naturale (sol, ape dulci și marine) în cantități semnificative, care pot asigura transferul orizontal prin transformare genetică. El este eliberat din celule bacteriene lizate sau muribunde.

Cantitatea relativ mică de ADN din celulele bacteriene individuale (0,0048 pg/celulă la *Bacillus subtilis*), comparativ cu celulele eucariote (38,7 pg, în celulele meristematice diploide din extremitatea apicală a rădăcinii la *Vicia faba* sau 4—8 pg/nucleu în celulele animale), este compensată, în anumite micronișe, prin numărul extrem de mare de bacterii.

Reanney, Gowland și Slater (1983) apreciază că cele $10^{13}$ celule prezente, în medie, într-un organism uman conțin ~8,0 g ADN chimic pur. Cele $10^{14}$ celule bacteriene prezente într-un organism uman adaugă 0,025 g. Deși aprecierile cantitative ale ADN sînt dificile se consideră că un ecosistem complex ca, de exemplu, cel corespunzător unui acru (4072 $m^2$) de sol de grădină ar putea conține ~30 g ADN provenit din biomasa moartă sau muribundă (microorganisme, resturi vegetale și microfaună). În unele lucrări conținînd date mai concrete se apreciază cantitatea de ADN liber din solul uscat ca oscilînd între 50 și 207 $\mu g$ ADN/g $sol^{-1}$. De menționat că acest ADN nu este dispersat uniform în sol și că în anumite micronișe cantitățile prezente pot depăși cu mult cifrele menționate.

Un factor favorizant este reprezentat de faptul că, în mod paradoxal, rezistența ADN în sol este mai mare decît în celulele de origine. Adsorbția pe argile minerale, pe coloizi, pe nisip sau pe lignina din celulele vegetale protejează ADN, asigurîndu-i o configurație moleculară mai condensată și/sau impunînd restricții spațiale care întîrzie sau chiar împiedică reacțiile de inactivare enzimatică.

Persistența ADN în sol este influențată de natura acestuia, ca și de pH, de numărul și de natura microorganismelor rezidente.

După Coughter și Stewart (1989), transformarea genetică se realizează în mod cert și în mediul marin, în special în sedimente, deoarece ADN legat

de sedimente este mai puțin sensibil la DNaze. În plus, prelegarea ADN transformant sau a celulelor receptoare de granule de nisip mărește frecvența transferului de 50 pînă la 3200 ori față de mediul lichid.

Aceste date au fost confirmate experimental de Lorentz și colab. (1988), care au demonstrat experimental existența transformării genetice la *Bacillus subtilis* cînd celulele bacteriene și moleculele de ADN sînt amestecate cu granule de nisip: celulele legate foarte apropiat de aceeași particulă de sol sînt mai stabile și mai apte să schimbe ADN.

Capacitatea de transformare genetică în natură a fost evidențiată la o gamă largă de bacterii care include: *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Actinomyces* sp., *Mycobacterium* sp., *Archaebacteria* și *Synechococcus* sp.

Mediul natural poate asigura și celelalte condiții care asigură transformarea genetică eficientă. Între acestea, starea de competență care poate fi indusă, probabil, sub influența unor factori solubili, cînd aceștia ajung la o concentrație critică în mediu (echivalentă unei densități de $\sim 10^8$ bacterii/ml). Morrison (1983) consideră competența ca o modificare fiziologică complexă (asociată cu sinteza a 16 proteine noi), echivalînd cu o stare de diferențiere celulară temporară: lungimea celulelor competente crește de ~8 ori, pentru a reveni la normal după încetarea acestei stări; cresc mai lent; sînt mai sensibile la liză; sintetizează mureinhidrolaze noi, care incizează matricea peptidoglicanică înainte de înglobarea ADN. Translocarea ADN prin membrana celulară necesită consum de energie furnizată de gradientul protonic.

În general, celulele Gram-pozitive pot înglobа și ADN heterospecific, în timp ce bacteriile Gram-negative, capabile de o discriminare mai riguroasă, favorizează înglobarea de ADN propriu.

*Utilizarea ADN ca nutrient.* Kahn și Smith (1984), precum și Stewart și Carlson (1986) au evidențiat un fenomen oarecum neașteptat: numeroase bacterii transformabile natural utilizează derivați ai ADN (purine, pirimidine, dezoxiriboză) ca surse de N, C și energie după degradarea ADN înglobat. Astfel, la *Haemophilus* sp. ~ 15% din ADN este integrat prin recombinare genetică, în timp ce restul este degradat și folosit în metabolism. La *Streptococcus pneumoniae* și la *Bacillus subtilis* acest raport este de 50%.

Pe această bază, Coughter și Stewart (1989) consideră că răspîndirea largă a mecanismelor specifice și nespecifice de înglobare a ADN în condiții naturale ar reflecta nu numai „nevoia" de transfer genetic și de variabilitate, ci și nevoia utilizării unor surse alternative de N, C și energie.

Răspunzînd unor exigențe fiziologice importante, ambele procese au contribuit, probabil, la evoluția transformării genetice în natură.

### Conjugarea bacteriană în natură

Demonstrată ca posibilă experimental în solul steril și nesteril (Trevors și Starodub, 1987), conjugarea bacteriană se poate realiza în natură în regiunile de mari concentrații bacteriene, respectiv în microcolonii sau la diferite interfețe (lichid/aer, solid/lichid sau solid/solid). Este influențată de temperatură (optim 25—38°C), pH, umiditate etc., care acționează probabil indirect, influențînd ritmul de formare a cuplurilor de conjugare, ca și de supraviețuire a celor doi parteneri.

A fost semnalată la: *Escherichia coli, Pseudomonas aerogenes, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Rhizobium* sp.,

*Streptomyces (S. flavovirens, S. coelicolor, S. lividans)* etc. și la unele bacterii acvatice*.

În general, se transmit plasmide. Cum transferul este corelat cu replicarea, el necesită energie și implică un grad semnificativ de corelare cu activitatea metabolică a partenerilor în conjugare.

Comparativ cu alte mecanisme de transfer de material genetic la bacterii (transformarea genetică, transducția fagică etc.), conjugarea pare să fie un mecanism privilegiat în natură. Datorită particularității plasmidelor al căror transfer nu necesită omologie genetică, nu este corelat cu stări fiziologice particulare și este eficient la un spectru larg de gazde.

### Transducția fagică în natură

Experimental, utilizînd cuplul *Pseudomonas aeruginosa* / fagul F 116, Morrison și colab. (1979) au demonstrat existența transferului genetic în medii de apă dulce.

Ulterior, Zeph și Stotzky (1988) au demonstrat transducția genetică în sol steril, ca și în solul normal nesteril, utilizînd cuplul fag P 1/*E. coli*. S-a demonstrat, de asemenea, că frecvența transducției este mai mare în mediile cu populații bogate în bacterii și că transductanții supraviețuiesc în solul nesteril pînă la 28 de zile.

Transducția genetică este favorizată de faptul că cele mai multe genomuri fagice există în natură în stare integrată, ca profag (la *Pseudomonas aeruginosa* în 100% din cazuri) și că multe bacterii sînt polilizogene (putînd să conțină pînă la 8 genomuri fagice/celulă). Un alt factor favorizant este reprezentat de intervenția fagilor extracelulari (greu de cuantificat), dar care în mod cert „supraviețuiesc" unor condiții (frig, radiații, lipsă de nutrienți etc.) în care celulele-gazdă mor. În plus, fagii adsorbiți pe particule din sol, nisip, argile sînt protejați de inactivare. Capacitatea fagilor de a alterna între o stare intracelulară (asociată cu o replicare masivă) și alta extracelulară poate fi considerată ca parte a unei strategii de supraviețuire îndelungată în natură.

În raport cu celelalte mecanisme de transfer de gene, transducția este un mecanism mai specific, deoarece depășește granițele de gen numai în 0,3% din cazuri (Matin și colab., 1989).

Marea corespondență a procentului de baze (G + C%) în structura ADN cromosomal (32 — 56% la *Bacillus*) și în genomul fagilor respectivi (31—60%) reprezintă mărturia unor interrelații genetice vechi între cei doi parteneri și sugerează că în cursul coexistenței lor îndelungate în natură selecția a tratat ADN fagic ca pe un constituent normal al ADN bacterian.

### Transferul de gene interregnuri

Pînă în ultimii ani, singurul caz de transfer natural de gene bacteriene în celulele eucariote era cel determinat de infecția unor plante cu *Agrobacterium tumefaciens*, agentul patogen al bolii „Crown gall" (cancerul bacterian al plantelor)**. În acest proces, un rol esențial revine genelor din structura plasmidei Ti („Tumor inducing").

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 354.

** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 440.

Relativ recent, Heinemann și Sprague jr. (1989) au demonstrat posibilitatea transferului plasmidelor cu proprietăți de factor de sex de la *Escherichia coli* la *Saccharomyces cerevisiae*. Pe baza unor criterii fizice și genetice, ei consideră că transferul se realizează printr-un proces de conjugare. Unele date experimentale îndreptățesc supoziția că procesul de conjugare între bacterii și celulele vegetale sau animale este frecvent posibil, chiar cînd bacteriile nu poartă plasmide specializate pentru inducția tumorilor.

Fenomenul este confirmat de Jikorski și colab. (1990) pentru cuplul *E. coli*/*Saccharomyces pombe*. Ambele studii demonstrează, fără echivoc, posibilitatea transferului de gene între organisme aparținînd unor regnuri diferite *(Monera (Procaryotae)* și respectiv *Fungi)* și existența, probabil mai răspîndită, a acestui mecanism de transfer între specii foarte îndepărtate genetic. Bacteriile apte de o mare promiscuitate sexuală ar putea grefa gene în arborele evolutiv prin procese de transmitere „laterală".

Fenomenul poate avea o importanță deosebită în evoluție, deoarece ar crea organisme cu un potențial evolutiv unic.

Prevalența și semnificația acestui proces în natură rămân să fie determinate, dar Jikorski (1990) citează cîteva argumente în favoarea sa ca, de exemplu: 1) asemănările mari și neașteptate dintre alcool dehidrogenaza bacteriană și cea a unor levuri (Williams și Paquin, 1987); 2) asemănarea unor izopenicilin-N-sintetaze fungice și bacteriene (Ramon și colab., 1987).

### Semnificația interacțiunilor genetice în natură

Analiza cunoștințelor actuale referitoare la modalitățile de transfer de material genetic în mediile naturale permite următoarele concluzii:

*Transferul de gene în natură este favorizat de următoarele condiții* (Reanney și colab., 1983):

1) Densitatea mare a populațiilor bacteriene metabolic active în anumite medii (rizosferă, microbiota intestinală etc.).

2) Acumularea lor pe diferite suprafețe și interfețe (lichid/aer, solid/lichid, solid/solid etc.). În sol, bacteriile apar în colonii mici pe particulele organice, datorită nevoii de a le folosi ca nutrienți, precum și din cauză capacității argilelor de a adsorbi celulele bacteriene. Deși particulele organice reprezintă numai ~ 15% din suprafețele disponibile din sol, ele poartă >60% din bacteriile detectabile.

3) Cantitatea relativ mare de ADN eliberat de biomasa moartă sau muribundă.

4) Rezistența mare a ADN extracelular în soluri cu conținut mare de coloizi.

5) Concentrația mare a nutrienților în anumite nișe favorizate.

6) Spectru larg de gazde conferit de plasmide, capacitatea lor de a iniția procese de transfer genetic și de a se menține în populațiile bacteriene.

7) Marea capacitate de replicare a ADN „egoist" și tendința sa de răspîndire „epidemică" în populație.

*Transferul de gene în natură este limitat de următoarele condiții:*

1) Frecvența mare a stărilor de latență și ritmul redus de diviziune. Astfel, în sol, numai 15—30% din bacterii sînt active. Aportul de energie redus și condițiile de mediu neadecvate fac ca, în unele cazuri, durata unei generații să fie de cîteva sute de ori mai mare decît în condiții de laborator. După Babnik și Paul (1970), în solurile de cîmpie, bacteriile se divid

numai de cîteva ori pe an. În solul bogat în nutrienți, timpul de generație este de ~14,5 ore, iar în cel de pădure de minim 24 de ore.

2) Procesele de transfer sînt corelate cu replicarea ADN, iar efectele lor decelabile sînt condiționate de recombinări genetice consecutive. Or, în natură cea mai mare parte din ADN este în stare nereplicabilă.

3) Separarea spațială și temporală a bacteriilor active în mediile naturale împiedică transferul de gene, care este condiționat de apropierea fizică dintre parteneri.

4) Prezența în natură a diferite substrate (lectine, mucigeluri etc.) capabile să imobilizeze temporar bacteriile.

5) Existența unor bariere genetice capabile să se constituie în obstacole pentru transferul de gene (recunoașteri de suprafață de tip nonself) sau pentru recombinarea genetică (intervenția enzimelor de restricție).

### Rolul genelor „egoiste" în mediile naturale

Crick (1979), precum și Orgel și Crick (1980) au descris sub denumirea de gene „egoiste" („Selfish genes") o serie de elemente genetice prezente în structura genomului bacterian (cromosom și plasmide), avînd două particularități fundamentale:

1) se formează cînd o secvență de ADN „se răspîndește", producînd copii adiționale ale propriei sale structuri în genom și

2) sînt lipsite de orice funcție (în afară de capacitatea de a se replica) sau au numai o funcție neînsemnată și, ca urmare, nu aduc nici o contribuție specifică la fenotipul organismului-gazdă.

Datorită proprietăților lor, elementele genetice transpozabile (de exemplu, secvențele de inserție (SI) descrise la procariote) pot fi considerate ca gene „egoiste" (Ford, Doolittle și Sapienza (1981).

Astfel, spre exemplu, secvențele de inserție, deși nu au *per se* un efect fenotipic, pot avea efecte importante asupra particularităților genetice ale bacteriilor purtătoare, datorită următoarelor funcții:

1) pot media integrarea unei plasmide sau a unui transpozon în structura genomului;

2) pot determina restructurări interne cromosomale;

3) se pot deplasa în localizări genetice noi, afectînd pozitiv sau negativ exprimarea genelor din locul în care pleacă sau în care se inseră. Inserția lîngă o genă tăcută o poate activa. Inserția în interiorul unei gene funcționale întrerupe secvența codificatoare și inactivează atît gena respectivă, cît și o parte din secvența de ADN care îi urmează (mutații polare).

În felul acesta, secvențele de inserție (SI) pot servi ca factori de recombinare între cromosomul bacterian și alte elemente genetice, care, deși nu sînt deloc omologe din punct de vedere genetic, poartă aceleași SI. Ele conferă un mare potențial de variabilitate, legitimizînd la nivel molecular recombinările „nelegitime".

Posibilitatea intervenției elementelor genetice transpozabile în variabilitatea bacteriilor în mediul natural este ilustrată de studiul SI la *E. coli*. S-a demonstrat că diferitele tulpini izolate din natură diferă prin numărul, natura și localizarea SI în cromosomul bacterian. *E. coli* conține 7 tipuri diferite de SI, localizate, în general, într-o regiune considerată ca deosebit

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 149, p. 120.

de variabilă (*pro* A → *lac* și puțin dincolo de acest marker), reprezentînd ~ 5% din mărimea genomului. Astfel, *E. coli K 12* conține 34 SI. Între acestea, numărul SI 1 variază între 0 și 30/per cromosom, iar SI 5 între 0 și 11. Tulpinile de *Shigella* conțin > 100 SI.

## Rolul genelor criptice în natură

Genele criptice reprezintă secvențe specifice de ADN, fenotipic inactive („tăcute"), care, în mod normal, nu sînt exprimate în celulele bacteriene de tip sălbatic, dar care pot fi reactivate — ca un eveniment rar — în cîteva celule dintr-o populație, ca rezultat al unor mutații, recombinări, inserții de elemente genetice transpozabile etc.* (Lauer și colab., 1980).

Un caz tipic este cel al operonului bg 1 BSRC de la *E. coli K 12*, care codifică posibilitatea de catabolizare a β-glucozizilor. Normal inactive, ele pot fi activate fie de o mutație localizată la nivelul genei represor, fie de activarea regiunii promotor, ca rezultat al inserției unei secvențe de inserție (SI) în apropierea genelor structurale. Activarea lor pe oricare din cele două căi menționate furnizează o cale de diversitate genetică, prin apariția unor funcții integral noi (Riley, 1989).

După Hall și colab. (1989), genele criptice ar forma un rezervor genetic endogen versatil, care mărește potențialul adaptativ al unei specii. Importanța lor ar fi esențială, deoarece măresc repertoriul genetic al fiecărei specii bacteriene prin faptul că, deși sînt „tăcute", la unii indivizi pot fi redeșteptate în generațiile următoare. Exprimarea lor sub influența unor factori din mediu ar putea determina supraviețuirea numai a acelor celule din populația respectivă care poartă o genă criptică devenită funcțională.

Genele criptice ar putea interveni și ca un mecanism de reglare metabolică, activ mai degrabă la nivel populațional decît la nivelul fiecărei celule din populație. Activarea lor ar putea avea un rol deosebit de important nu numai în adaptarea la anumite condiții particulare de mediu, ci și în evoluția în timp a microorganismelor, în general, și a bacteriilor, în special.

*

Deși numeroase date de laborator demonstrează ușurința cu care bacteriile pot schimba informația genetică atît în cadrul speciei, cît și cu alte specii sau genuri, observații categorice arată că ele și-au păstrat identitatea taxonomică și fenotipică de-a lungul unor mari intervale de timp.

Deși, de-a lungul evoluției au întîlnit numeroase oportunități de rearanjare a informației genetice sau de încorporare de material genetic heterolog, ele și-au păstrat nealterată identitatea în liniile sale esențiale.

Genomurile cromosomale bacteriene rămîn, cel puțin pe termen scurt, stabile în ciuda ratei potențial înalte de transfer de gene, care s-a produs, în mod cert, de-a lungul existenței lor. Ca urmare, spre exemplu, tulpinile de *Escherichia coli*, în forma lor actuală, nu diferă prin nici o proprietate esențială de bacteria descoperită de Ehrlich în anul 1885.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 69.

# SIMBIOZA

**„Simbioza nu este o curiozitate a naturii, ci o parte a unui șir neîntrerupt de interacțiuni între organismele vii, o variație pe tema microorganisme/organisme mai evoluate".**

G. W. GOODAY
S. A. DOONAN

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# SIMBIOZA

**„Deși este evident că existența sistemelor biologice implică interdependența la toate nivelele — molecular, organitic și celular — este mult mai util ca termenul de simbioză să fie limitat la sistemele interdependente, în care cei doi parteneri sînt, cel puțin teoretic, capabili de existență autonomă. El nu poate fi extins la plasmide și la virusurile intracelulare, care nu sînt nici celule și nici asemănătoare celulelor".**

R. Y. STANIER

Conceptul de simbioză a fost formulat de De Bary (1879), cu ocazia studiilor asupra lichenilor pentru a defini „viața împreună" a unor organisme deosebite („die Erscheinung des Zusammenlebens ungleichnamiger Organismen"), indiferent dacă asocierea are efect benefic sau dăunător asupra unuia sau a celor doi parteneri.

În sens strict, termenul de simbioză denotă o coabitare de lungă durată, în cursul căreia două sau ocazional mai multe specii diferite trăiesc în imediată apropiere, dobîndind beneficii reciproce, din interacțiunile lor.

Tendința actuală este de a folosi termenul de simbioză în sensul său originar, sensul strict corespunzînd conceptului de mutualism. Unele simbioze sînt determinate de interrelația dintre două microorganisme sau între un microorganism (microsimbiont) și un macrosimbiont.

## Clasificare

1) În funcție de localizarea microorganismelor simbionte:

*Ectosimbioze* — microorganismele rămîn în afara celulelor și țesuturilor gazdei. Spre exemplu, bacteriile inclavate în teaca gelatinoasă a cianobacteriilor („alge" albastre-verzi), pe suprafața frunzelor, în organele luminoase ale peștilor, în cavitățile corpului (intestinul mamiferelor etc.).

*Endosimbioze (endocitobioze)* — corespunzătoare situației în care un organism *(endosimbiont, endocitobiont* sau engl. „inhabitant") este localizat în celulele și/sau țesuturile gazdei (engl. „exhabitant"), în general, un organism mai mare.

2) În funcție de gradul de dependență:

*Simbioze facultative* — cei doi parteneri pot exista în natură liberi sau asociați. Spre exemplu, în prezența unor cantități adecvate de N anorganic, bacteriile din genul *Rhizobium* și plantele leguminoase se pot dezvolta și separat, probabil nu atît de bine ca în simbioză. În mod asemănător, fungii din licheni pot fi cultivați și *in vitro*.

*Simbioze ecologic obligate* — de exemplu, bacteriile și protozoarele din rumen care asigură degradarea celulozei la compuși intermediari accesibili gazdei.

*Simbioze efectiv obligate* (ereditare) — cei doi parteneri nu au existență liberă în natură și nu pot crește independent *in vitro*. Este cazul unor nevertebrate marine, care au nevoie absolută de alge endosimbionte.

3) În funcție de natura relației:

Precizarea naturii unei simbioze, respectiv a beneficiarului și a beneficiului se determină comparînd gradul de adaptare a celor doi parteneri cînd trăiesc independent și respectiv asociat.

*Simbioze mutualiste* — cînd adaptarea ambelor organisme este mai mare fiind împreună decît cînd sînt separate.

*Simbioze parazitare* — cînd unul dintre parteneri este mai adaptat fiind asociați decît cînd sînt separați.

După Dubos (1965), termenii de simbioză mutualistă sau parazitară implică cu necesitate o stare de permanență a relației, care are frecvent un caracter dinamic. În acest sens poate fi citat cazul unor microorganisme în trecut parazitare, care au evoluat spre comensalism sau chiar spre simbioze mutualiste sau invers, de trecere de la mutualism sau comensalism la parazit patogen (în cazul microbiotei intestinale la animalele imunosupresate sau iradiate general).

## CONDIȚIILE DE INSTALARE A SIMBIOZELOR

„Capacitatea de a încorpora și menține endosimbionți celulari este unul din atributele biologice distinctive ale celulei eucariote, totdeauna absent la procariote".

R. Y. Stanier
M. Doudoroff
E. A. Adelberg

Instalarea unei relații de asociere biologică de tip simbiotic implică, după Dubos și Kessler (1963), un anumit grad de *permanență* (în sensul persistenței pe cea mai mare parte a vieții organismelor participante) și o anumită *specificitate* (alegerea partenerului nu este întîmplătoare, ci se realizează pe baza unui grad semnificativ de selectivitate). Aceste două particularități permit, de altfel, deosebirea simbiozei de protocooperare.

Instalarea endosimbiozei este condiționată de următorii factori:

1) pătrunderea endosimbiontului în celula-gazdă;

2) evitarea degradării de către enzimele litice ale acesteia;

3) păstrarea funcțiilor esențiale ale celulei-gazdă;

4) reproducerea simbiontului pentru a asigura menținerea relației și un raport echilibrat simbiont/gazdă;

5) supraviețuirea lui în condițiile transferului la descendenți.

Condiția esențială pentru îndeplinirea acestor deziderate este o anumită compatibilitate care asigură toleranța reciprocă. Fenomenul explică de ce un număr atît de mare de alge interacționează simbiotic cu o varietate mare de gazde.

**Specificitatea** este o proprietate condiționată de particularități aparținînd ambilor parteneri și se bazează pe fenomene de recunoaștere reciprocă. Pe plan biologic general, ea reprezintă o expresie a complementarității particularităților celor doi parteneri care interacționează dinamic.

În acest context, fiecare organism participă cu o serie de factori mai mult sau mai puțin critici pentru partenerul său. Ca urmare, cu cît numărul factorilor care interacționează este mai mare și cu cît unii dintre ei sînt mai selectivi cu atît gradul de specificitate simbiotică va fi mai ridicat. Ca regulă generală, specificitatea mare corespunde capacității de simbioză cu un spectru limitat de asociați compatibili care au caracteristici structurale și biochimice adaptate în mod particular la partenerii lor.

În cazurile extreme, marea specificitate a unor funcții poate determina limitarea unui organism la un singur partener-gazdă sau la cîțiva parteneri înrudiți.

Invers, specificitatea redusă este expresia unei promiscuități simbiotice excesive, reflectată prin capacitatea de asociere cu un număr mare de tulpini, specii și genuri care le pot satisface exigențele vieții. Este cazul fungilor de micorize (vezi cap. „Micorizele"), care pot infecta un număr mare de specii diferite de plante, acestea la rîndul lor acceptînd un număr mare de fungi de micorize.

Numeroase date de laborator pledează pentru existența unor interrelații specifice endosimbiont/gazdă:

Infectarea „gazdelor" animale provenite din culturi de laborator aposimbiotice cu diferite tulpini sau specii de alge are ca rezultat formarea de noi sisteme simbiotice permanente numai cînd este folosită tulpina de algă originară a simbiozei. Astfel, Reisser și Wiesser (1984) au demonstrat că asocierea stabilă *Paramecium bursaria/Chlorella* sp. nu se realizează cu orice tulpină algală, ci numai cu propria tulpină originară „corectă".

În mod asemănător, *Hydra viridissima* înglobează numai anumite alge și le respinge pe cele nepotrivite. Eficiența mare cu care înglobează tulpini de *Chlorella* este anulată dacă alga este tratată în prealabil cu enzime proteolitice sau cu concanavalină A (Moulder, 1985). La rîndul lor, speciile de *Hydra* diferă larg în capacitatea de a fi infectate permanent cu tulpini de *Chlorella*. *H. vulgaris* și *H. attenuata* se infectează foarte ușor, iar *Pelmatohydra* niciodată.

Fenomenele de recunoaștere specifică au un rol foarte important și în formarea și în asamblarea materialului membranar special perialgal.

În mod normal, celulele algale tinere sînt înconjurate imediat după înglobare de o membrană individuală strîns legată de suprafața lor (facilitînd astfel schimbul de nutrienți), care delimitează *vacuola perialgală*. Dacă în prealabil, suprafața algelor a fost modificată cu ajutorul lectinelor, al anticorpilor sau cu enzime glico- sau proteolitice, celulele respective, deși sînt normal apte de simbioză, sînt înglobate în vacuole de digestie.

În mod asemănător, particulele inerte (latex, carmin etc.) sînt sechestrate nu în vacuole individuale, ci în vacuole mari apicale („Food vacuoles"), rezultate, probabil, din coalescența unor vacuole mai mici. Acestea nu migrează spre baza celulei, ci rămîn localizate și sînt expulzate în aproximativ 24 de ore.

Fenomenele de recunoaștere sînt dependente atît de simbiont, cît și de gazdă, fiind benefice pentru ambii parteneri (Dyer, 1989).

## Menținerea simbiozelor

Persistența asocierilor simbiotice este condiționată de transmiterea eficientă de la o generație la alta.

Relativ simplu în cazul ectosimbiozelor, acest proces se realizează în endosimbioze pe două căi:

1) **Transmiterea directă** corespunde situației în care microorganismele trăiesc permanent în țesuturile gazdei, trecînd direct de la o generație la alta.

În forma cea mai simplă a endosimbionților algali ai protozoarelor, cei doi parteneri cresc și se divid cu aproximativ aceeași viteză, celulele-fiice ale gazdei primind o proporție egală de celule-algale. Procesul este cel mai adesea perfect reglat în așa fel încît o celulă-gazdă care conține normal doi endosimbionți se divide formînd două celule-surori, care primesc, fiecare, cîte un simbiont. Acesta se divide și restabilește raportul inițial de două alge/celulă-gazdă.

La gazdele cu reproducere sexuată, transmiterea directă se realizează printr-un proces complex, care asigură infectarea citoplasmei oului. În cazul plantei *Psychotria bacteriophyla*, bacteriile endosimbiotice se localizează în sămînță, asigurînd astfel transmiterea la descendenți.

2) **Transmiterea prin infecție** este întîlnită în cazul în care endosimbionții rămîn intracelular numai o parte din ciclul de viață al gazdei. Într-o anumită etapă, ei sînt eliberați în mediul extracelular în așa fel încît fiecare generație a gazdei trebuie reinfectată cu simbionți, care au temporar o existență liberă.

Datorită acestui mecanism, incidența simbiozelor prin reinfecții prezintă — în mod caracteristic — variații mari sezoniere, în funcție de abundența algelor infectate. Mecanismul de transmitere este diferit în raport cu natura organismului-gazdă.

În cazul protozoarelor și al poriferelor, transmiterea se realizează prin fenomene tipice de fagocitoză.

În cel al cuplului *Hydra viridissima*/*Chlorella* sp., alga este introdusă în celenteronul hidrei aposimbiotice, după care este endocitată în cîteva minute, prin capturarea ei în pliurile microvililor sau ale voalurilor de citoplasmă de pe suprafața celulelor digestive. Înglobarea încetează în două-trei ore cînd se găsesc 5—9 alge/celulă, după care numărul normal (12—20 în funcție de condițiile de cultivare) este restabilit prin diviziunea algelor infectante. Factorul limitant al înglobării ar fi, după Muscatine și colab. (1975), suprafața membranei celulare a gazdei, disponibilă pentru endocitoză.

În sistemul *Convoluta roscoffensis*/endosimbionți de *Platymonas convolutae* aceștia sînt ingerați ca hrană imediat după apariția nevertebratului. Ei se localizează în ramificațiile sincițiului digestiv originar, după care pătrund intracelular și, uneori, intercelular între celulele musculare.

În cazul organismelor mai evoluate, cum sînt insectele, au fost descrise conexiuni anatomice între intestin și vagin. Simbionții intestinali sînt depuși pe suprafața ouălor pe măsură ce trec în ovipozitor. În momentul ecloziunii, larvele se contaminează, ingerînd învelișul contaminat al ouălor. O adaptare cu totul particulară este semnalată de Alexander (1971), în

cazul insectei *Coptosoma scutellatum* la care femela depune un cocon plin cu bacterii între fiecare pereche de ouă. În momentul ecloziunii, larva introduce proboscisul în cocon și se infectează sugînd conținutul bacterian (fig. 88).

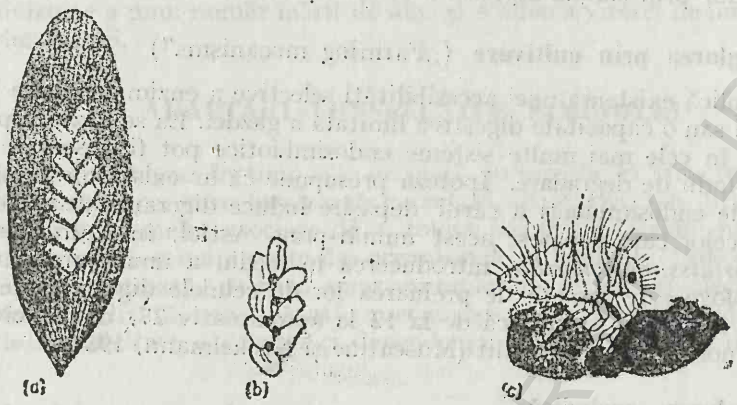



Fig. 88. — *Coptosoma scutellatum*. A. Ouă depuse pe frunza unei plante leguminoase. B. Aspectul ouălor văzute de pe partea inferioară, evidențiind coconii plini cu bacterii simbiotice dispuse între fiecare pereche de ouă. C. O larvă nou eclozată sugînd suspensia de simbionți dintr-un cocon (după Müller, 1967).

## REGLAREA INTERACȚIUNILOR SIMBIOTICE

Succesul evolutiv al sistemelor endosimbiotice depinde, cel puțin în parte, de menținerea stabilității lor chiar în condiții dezavantajoase pentru unul sau pentru ambii parteneri. La rîndul său, stabilitatea îndelungată a asocierii implică existența unui mecanism de reglare menit să asigure un raport echilibrat între endosimbiont și organismul-gazdă.

După Muscatine (1985, 1989), una dintre regulile fundamentale este ca viteza medie specifică de creștere și multiplicare a endosimbiontului să fie egală sau puțin mai mare decît cea a celulelor-gazdă pe care le ocupă. Reacția globală este:

$$\mu \text{ endosimbiont} \geqslant \mu \text{ celula-gazdă}$$

Această ecuație este satisfăcută relativ ușor în cazul unor cupluri ca, de exemplu, *Hydra viridissima/Chlorella* sp., alga avînd o viteză intrinsecă de creștere mai mare decît cea a celulelor în care este localizată.

Experimental s-a demonstrat în cazul celor mai multe cupluri studiate că pentru fiecare set de condiții există un raport echilibrat între biomasa celor doi parteneri. Dacă acest raport este perturbat sub influența condițiilor de mediu intervin o serie de mecanisme reglatoare care protejează celulele-gazdă de supradezvoltarea endosimbiontului, ajustînd numărul acestora la capacitatea gazdei de a-i purta.

Pe baza datelor experimentale au fost propuse mai multe mecanisme ipotetice, nu foarte net delimitate.

**Reglarea digestivă**

Este caracteristică celor mai primitive sisteme. Ea reglează numărul simbionților prin simpla digestie a celor supranumerari.

**Reglarea prin cultivare** („Farming mecanisms")

Implică existența unei accesibilități selective a enzimelor litice la endosimbionți sau o capacitate digestivă limitată a gazdei. Ea se bazează pe observația că în cele mai multe sisteme endosimbiotice pot fi observate alge în diferite stadii de degradare. Ipoteza presupune că ar exista un număr critic specific de endosimbionți a cărui depășire induce digerarea de către celula-gazdă a celor care depășesc acest număr-prag. Astfel, în cadrul sistemului *Hydra viridissima*/*Chlorella*, introducerea în mediu a unui număr mare de alge omologe este urmată de preluarea lor de celulele digestive ale gazdei. Numărul lor poate să crească de la 12 la aproximativ 27, dar în cîteva ore raportul normal este restabilit (Muscatine și Neckelmann, 1984).

**Reglarea ecologică**

Reprezintă un mecanism alternativ bazat pe observația că, cel puțin în unele cupluri, atacul digestiv ar fi foarte rar. Se admite că, în general, algele vii ar împiedica fuziunea lizosomilor cu vacuolele perialgale și că ar fi digerate numai algele moarte.

După această ipoteză, menținerea unui raport echilibrat între biomasa endosimbionților și cea a celulelor gazdei ar fi reglată de cantitatea de nutrienți disponibili din mediu (aminoacizi, săruri minerale, $CO_2$ etc.) și de alte condiții externe (intensitatea luminii) caracteristice nișei ecologice respective. Astfel, în cadrul cuplului *Paramecium bursaria*/*Clorella* sp., rata de creștere a celor doi parteneri este reglată în așa fel încît pentru fiecare intensitate a luminii există o anumită mărime constantă a populației algale/celula-gazdă. Ca urmare, cînd intensitatea luminii crește, numărul algelor crește, de asemenea, iar fotosinteza stimulată furnizează cantități mari de oxigen și maltoză rezultate din metabolismul algal. Ritmul de diviziune al *P. bursaria* este mărit, restabilind raportul optim dintre cei doi parteneri. Cînd intensitatea luminii scade, cele două procese se modifică în sens invers.

Au mai fost propuse și alte mecanisme active în anumite sisteme.

a) Expulzarea simbionților supranumerari a fost descrisă de mai mulți cercetători. După Hoegh-Guldberg și colab. (1987), acest mecanism este rar întîlnit sau chiar excepțional întîlnit *in situ* la coralii din Marea Roșie. El este însă frecvent la aceeași specie în condiții de laborator, probabil ca o consecință a stresului reprezentat de tranziția din natură într-un mediu artificial.

b) Inhibarea creșterii endosimbionților prin secreția de către gazdă a unui inhibitor sau stimularea eliberării în mediu a unor substanțe organice care ar putea intensifica sinteza constituenților gazdei.

Muscatine și Neckelman (1981), precum și Taylor, Muscatine și Jefferson (1989) au evidențiat rolul dereglator al excesului de nutrienți. Într-un sistem în care creșterea algelor este limitată de nutrienți, adăugarea mai multor nutrienți anorganici la mediul de menținere determină o creștere importantă a numărului algelor per celulă digestivă, ducînd în cîteva zile la moar-

tea organismului-gazdă. Pe baza unui model computerizat cu valoare euristică s-a ajuns la concluzia că procesul de dereglare este complex, implicînd eliberarea algelor de mecanismul de creștere dependent de densitate, intrarea în diviziune a unui număr mărit de alge și scăderea vitezei de multiplicare a celulelor-gazdei.

## ADAPTĂRI CONSECUTIVE SIMBIOZEI

Evoluția simbiozei în timp este asociată cu modificări structurale, biochimice și fiziologice, care furnizează caractere adaptative noi, utile pentru capacitatea organismelor asociate de a tolera condiții de mediu noi, uneori extreme, și elimină o mare parte din organismele individuale. Dubos și Kessler (1963) demonstrează, pe baza unor exemple din natură, că fiecare particularitate specializată nou apărută, precum și pierderile de funcții măresc gradul de specificitate a relației și dependența reciprocă a celor doi parteneri.

**Adaptări structurale:**

— O adaptare specifică, evidențiată la cianele, este reprezentată de reducerea straturilor peretelui celular comparativ cu cianobacteriile libere. Ea are drept consecință facilitarea schimbului de metaboliți între cei doi parteneri.

— La *Tridacnia*, zooxantelele sînt efectiv cultivate în număr mare în jurul unor „organe hialine" care permit luminii să pătrundă, asigurînd iluminarea mai eficientă și, deci, favorizînd fotosinteza.

— Bacteriile fixatoare de $N_2$ simbiotice din genul *Rhizobium* induc procese morfogenetice specifice, legate de apariția nodozităților cu funcții esențiale.

În mod asemănător, fungii de micorize determină adaptări structurale dependente exclusiv de interacțiunea dintre microorganisme și plante.

**Adaptări biochimice și funcționale:**

— *Chlorella* simbiotică cu *Paramecium bursaria* are o ribulozo-1,5-bifosfat carboxilază cu o mai mare afinitate pentru $CO_2$ decît echivalenții săi liberi. În plus, alga simbiotică, spre deosebire de formele sale libere, se divide *in situ* numai în 2 sau 4 celule. Viteza redusă de diviziune asociată cu o activitate fotosintetică mărită și cu o capacitate de a elimina mai eficient fotosintatul sînt considerate de Reisser și Wiessner (1984) ca un avantaj evolutiv decurgînd din adaptarea algelor la o nouă nișă ecologică.

— Nevertebratele care conțin alge simbiotice au un comportament fotopozitiv, uneori corelat cu numărul acestora. Acest comportament este suprimat după îndepărtarea simbionților.

— Spre deosebire de omologii săi aposimbiotici (axenici), *P. bursaria* „verde", la care alga *Chlorella* acționează ca un fotoreceptor, se acumulează într-un spot luminos cu un spectru de acțiune corespunzător celui al fotosintezei. Gradul de acumulare este dependent de intensitatea luminii și de mărimea populației algale. După Stanier și Cohen-Bazire (1970), protozoarul ar răspunde indirect, prin intermediul gradientului de $O_2$ intern creat de fotosinteză, deoarece efectul luminii este corelat cu tensiunea acestuia în celulă.

Nu se cunosc mecanismele moleculare care determină transducția stimulului recepționat de sistemul fotosintetic al algelor la aparatul ciliar al gazdei. Oricum, se realizează o coordonare endosimbiont/gazdă, care transformă practic cei doi parteneri într-o unitate funcțională cu o particularitate comportamentală nouă (Niess și colab., 1981; Reisser și Wiessner, 1984). Motivațiile rezultate din adaptările structurale, biochimice și fiziologice permit celor doi parteneri să ocupe habitate pe care nu le pot ocupa separat sau le furnizează proprietăți noi, utile, datorită cărora pot exista în medii intolerante, care individual i-ar putea elimina (Lewis, 1974) (fig. 91).

**Pierderile de funcții:**

Pe măsură ce în evoluția simbiozei în timp tot mai multe nevoi ale unui simbiont sînt satisfăcute de partenerul său, presiunea selecției asupra sa va scădea, iar structurile și funcțiile care nu mai sînt necesare degenerează sau sînt pierdute. Simbiontul modificat devine tot mai dependent de partenerul său, tot mai puțin adaptabil la noi parteneri, iar asociația tot mai necesară sau obligatorie.

Există numeroase exemple la insecte, la care microorganismele simbiotice suplinesc unele incapacități ale gazdei de a sintetiza factori esențiali pentru comportamentul reproductiv, pentru determinismul sexului etc. Lipsite de microsimbionți, multe insecte au ovare cu anomalii, nu mai depun ouă sau depun ouă neviabile, incapabile de dezvoltare.

*Convoluta roscoffensis* cu partener simbiotic este incapabilă să mai excrete reziduurile (acidul uric). La gazdele aposimbiotice, acidul uric se acumulează, putînd ajunge la concentrații toxice, pentru a dispărea după ce au fost infectate de partenerul algal.

## EVOLUȚIA SIMBIOZELOR

Dyer și Obar (1984), precum și Dyer (1989) propun următoarea succesiune de etape prin care o asociere simbiotică devine „mai obligatorie" și în același timp mai integrată:

1) Asocierea a două organisme heterospecifice, care schimbă nutrienți cu un anumit avantaj selectiv: cele două organisme se comportă mai bine asociat decît independent.

2) Presiunea selecției asigură dezvoltarea armonioasă a celor doi parteneri, prin coordonarea activității metabolice și a ritmului de diviziune în așa fel încît nici unul nu-l poate copleși pe celălalt. Această reglare se poate realiza inițial prin dezvoltarea de mecanisme de reglare enzimatice în fiecare partener acționînd asupra celuilalt.

3) Structurile sau funcțiile redundante dispar. Inițial, enzimele produse de ambii parteneri sînt pierdute de unul dintre ei. Ulterior apar modificările structurale (de exemplu, simplificarea structurii parietale a cianobacteriilor endosimbiotice).

Simbioza foarte eficientă evoluează spre coordonare la nivel genetic: selecția acționează pentru codificarea coordonată a produșilor genelor esențiale, ducînd la pierderea autonomiei ambilor parteneri. Relația devine obligatorie și, final, cele două genomuri asociate funcționează ca un genom mare perfect coordonat.

## Rolul endosimbiozei în geneza celulelor eucariote

Propusă încă din anul 1850 (Altman), ideea originii simbiotice a fost formulată în mai multe variante, cea mai cunoscută fiind ipoteza endosimbiozei seriale * (Margulis, 1967, 1981). În acord cu această ipoteză, organitele celulei eucariote (mitocondrii, flageli de tip eucariot, cloroplaste și microtubuli) au fost la origine bacterii libere, care au fost preluate prin endocitoză în asociere simbiotică de o celulă ancestrală mai mare. Se presupune că ele au putut evita digestia de către gazdă, obținînd de la aceasta diferiți nutrienți esențiali, la rîndul lor furnizîndu-i excedentul sintezelor lor.

Cu timpul, autonomia organismelor străine s-a pierdut progresiv, relația evoluînd spre o asociere simbiotică în care gazda a preluat întregul control. Esențială în acest proces a fost o modificare a sistemului genetic: o parte din determinanții genetici au fost translocați în genomul endosimbionților și încorporați în genomul nuclear al gazdei. În felul acesta, endosimbionții și-au pierdut statutul de organism, dobîndindu-l pe acela de organite. Ei și-au păstrat însă capacitatea de a se replica (evidențiată în cazul mitocondriilor), de a-și menține un genom propriu care poate suferi modificări prin mutații (de exemplu, mutațiile mitocondriale la *Saccharomyces cerevisiae*, mutațiile plastidiale la *Chlamydomonas)*.

Impulsul major pentru această evoluție structurală progresivă a fost reprezentat, după Stanier (1970), de necesitatea de a realiza o nouă modalitate de obținere a hranei, prin îmbunătățirea eficienței prădării, datorită capacității de a face endocitoză (caracter absent totdeauna la procariote).

Procesul s-a realizat în trei etape succesive:

1) Prima a corespuns formării protomitocondriilor și s-a realizat în momentul în care o bacterie-gazdă heterotrofă, facultativ anaerobă, a înglobat o bacterie aerobă posesoare a enzimelor ciclului Krebs.

2) Etapa a doua, corelată cu necesitățile de a găsi noi surse de nutrienți în mediu, s-a realizat prin asocierea cu unele bacterii mobile anaerobe asemănătoare spirochetelor actuale.

3) Ultima etapă, corespunzînd apariției eucariotelor fotosintetizante, s-a realizat prin endocitoza unor cianobacterii libere (fig. 89).

Datorită acestor modificări, fenotipul unei plante este definit de trei sisteme genetice: cel nuclear, propriu, genomul mitocondrial și genomul cloroplastelor, perfect integrate și coordonate în timp și în spațiu. Din punct de vedere evolutiv, celula vegetală poate fi considerată ca rezultat al unei comunități, formată din trei specii de bacterii intim asociate, care își coordonează activitățile pentru a produce fenotipul caracteristic.

Pentru a explica evoluția asociației, Whatley și Whatley (1984) citează cazul amibei *Pelomyxa palustris* (avînd ca precursor archebacteria *Thermoplasma acidophilum)*, care poartă două tipuri de bacterii simbiotice diferite ca dimensiuni, transmise de la o generație la alta. Ea are un nucleu de tip eucariot, dar este lipsită de mitocondrii. Amiba are un metabolism anaerob și contribuie cu puțin la metabolismul energetic global al asociației. Bacteriile aerobe simbiotice mici utilizează $O_2$, care ar fi toxic pentru gazdă, acționînd ca „organite" respiratorii, iar celelalte consumă granulații de glico-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 449.

gen depuse ca rezervă. Rata glicolizei este reglată în așa fel încît corespunde atît nevoilor gazdei, cît și celulelor simbiotice. *P. palustris* cu bacteriile asociate reprezintă un model actual care însumează proprietățile structurale și metabolice presupuse de ipoteza endosimbiotică necesare intermediarului protoeucariot, considerat de Whatley și Whatley (1984) ca o necesitate în evoluția celulelor eucariote vegetale și animale.

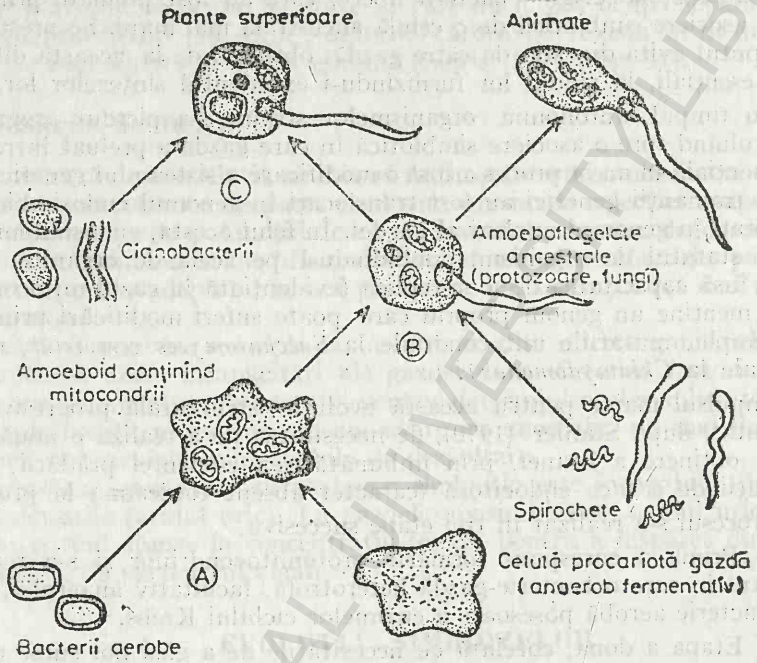



Fig. 89. — Reprezentarea schematică a celor trei faze ale ipotezei simbiozei seriale. **A.** Unirea unei bacterii mari, probabil anaerobă fermentativă, cu o bacterie aerobă, apărută recent, determină apariția unor protiste amoeboide, ai căror simbionți vor deveni mitocondrii. **B.** A doua simbioză ereditară reunește amoeboidul cu o spirochetă pentru a forma un amoeboflagelat ancestral, precursorul regnurilor *Fungi* și *Animalia*. **C.** Endosimbioza unor cianobacterii în amoeboflagelat duce la apariția cloroplastelor și respectiv a regnului *Plantae* (după Margulis, 1971).

Jeon (1983, 1987) furnizează un exemplu experimental de integrare genetică, cel puțin parțială, urmărind de-a lungul a 20 de ani relația dintre *Amoeba proteus* și anumite bacterii. Inițial, protozoarul este infectat cu un număr mare de bacterii (~ 150 000 per celulă) pe care le digeră. Apoi, efectele adverse scad progresiv și, după cîțiva ani, amiba-gazdă devine dependentă de bacterii și nu mai poate trăi în absența lor: simbioza are caracter obligatoriu. Ceva mai mult, transplantul nuclear între protozoarele infectate și cele neinfectate nu mai este tolerat, ca și cum unele gene s-au pierdut sau s-au modificat. Bacteriile simbiotice se comportă datorită asocierii îndelungate asemenea unor organite (,,Quasi-organelles'', Jeon, 1987). În citoplasma protozoarelor a fost semnalată prezența unor proteine de origine bacteriană, a căror funcție este necunoscută, dar care sînt absolut necesare pentru existența gazdei.

Relativ recent, Schwemmler (1989) a propus o ipoteză considerată de el ca un progres spre o teorie unificatoare a evoluției, în care descrie evoluția ca un proces continuu, de la „bing-bang" prin particule elementare și atomi pînă la om. În acest proces, pe lîngă micromecanismele cunoscute, simbioza ar avea un rol fundamental ca mecanism macroevolutiv, în formarea sistemelor complexe de celule vii pe bază de endocitobioză. Ipoteza include în faza de biogeneză, după nomenclatura autorului, stadiile de precit (precelular), procit (conceput ca arhetip al organismelor procariote), eucit (eucariot capabil de endocitoză) și policit (metazoare).

## SEMNIFICAȚIA BIOLOGICĂ A SIMBIOZELOR

**„Simbionții nu sînt altruiști..."**

M. ALEXANDER

În cazul simbiozelor, ca și al altor interrelații, dependența reciprocă a celor doi parteneri variază de la asocieri laxe pînă la cupluri în care interdependența este totală, formînd, în cazuri extreme, un sistem integrat, puțin diferit de cele care leagă între ele diferitele părți ale unui organism. Oricum, partenerii sistemelor simbiotice au un microhabitat comun, fie prin asociere intracelulară (endosimbioză), fie cel puțin prin contact fizic intim (ectosimbioză). De aceea, succesul lor evolutiv depinde de un anumit grad de coordonare, care rezultă din dezvoltarea unor particularități specifice comune simbiozei pe diferite nivele de organizare.

După Alexander (1971), simbionții nu s-au alăturat partenerilor lor pentru bunăstarea acestora, ci pentru că ei înșiși obțin ceva util în schimb. Ca urmare, coexistența asociației simbiotice este numai rar bazată pe o neutralitate totală, pentru că ea nu înseamnă numai ajutor mutual, ci și, probabil, un grad oarecare de exploatare mutuală. Cei doi parteneri se influențează fie reciproc, fie predominant unilateral, uneori foarte discret, în așa fel încît, deși efectul net, evident, este benefic, în centrul relației poate să existe un anumit grad de parazitism.

Aprecierea efectelor simbiozei se face separînd cei doi parteneri și studiindu-le comportamentul separat și în asociere. Tehnicile moderne au facilitat acest studiu, permițînd izolarea, cultivarea, studiul complex, structural, biochimic, fiziologic și comportamentul fiecărui simbiont într-un număr important de cazuri.

După cum rezultă din descrierile anterioare ale diferitelor tipuri de simbioze, ele suplinesc anumite deficiențe ale partenerilot respectivi și ale mediului ambiant, asigurînd:

1) un interschimb de nutrienți, mecanism esențial pentru interacțiunea celor mai mulți simbionți;
2) dispozitive de recunoaștere, apărare și favorizarea prădării;
3) protecție și
4) avantaje ecologice.

Datorită acestor influențe, în mediile naturale, organismele-gazdă cu simbionți au o fiziologie și un comportament foarte diferite de cele ale organismelor axenice, imprimate de prezența simbionților. Frecvent, simbionții funcționează ca o entitate autonomă și nu ca organisme diferite.

**Avantaje nutriționale.** În cele mai multe sisteme simbiotice studiate (alge/nevertebrate, alge/fungi etc.) s-a demonstrat, în mod categoric, transferul de nutrienți între cei doi parteneri. Studiile experimentale cu $^{14}CO_2$ au probat transferul moleculelor organice produse prin fotosinteză de la fotoautotrofe la heterotrofe. Astfel, *Hydra viridissima* primește aproximativ 45—50% din $^{14}C$ fixat prin fotosinteză. În plus, organismele-gazdă preiau glucidele insolubile rezultate din degenerarea și digerarea celulelor algale sau prin eliminarea substanțelor nedorite din algele sănătoase. În general, algele simbiotice excretă o cantitate mai mare de $^{14}C$ fixat decît echivalentele lor libere, ceea ce sugerează că partenerul nefotosintetic ar exercita un rol stimulator asupra excreției și/sau sintezei.

Natura glucidului excretat nu corespunde produsului major al fotosintezei, ci este corespunzător celui pe care partenerul nefotosintetic îl poate utiliza cel mai adesea în propriul său metabolism (tabelul nr. 18) și, în unele cazuri, după cum s-a demonstrat, un produs neutilizabil de către algă. Astfel, zoochlorelele sintetizează, indiferent de organismul-gazdă, și reține intracelular zaharoza și excretă fie maltoză, fie glucoză. Zooxantelele eliberează invariabil glicerol. Materialul preluat este folosit pentru încorporarea în glucide cu greutate moleculară mare, proteine și acizi nucleici.

*Tabelul nr. 18*

**Exemple de transfer al glucidelor de la simbiontul fotosintetizant la gazda heterotrofă**
(după Smith, Muscatine și Lewis, 1969)

| Organismul donator fotosintetizant | | Organismul receptor nefotosintetizant | |
|---|---|---|---|
| Organismul | Glucidul eliberat | Transformarea imediată a glucidului | Organismul |
| *Zoochlorella* | Maltoză, glucoză | Glicogen, pentoze | Nevertebrate marine |
| *Zooxantella* | Glicerol | Lipide, proteine | Nevertebrate marine |
| *Cyanobacteria* | Glucoză | Manitol | Fungi din licheni |
| *Chlorophyceae* | Polioli | Polioli | Fungi din licheni |
| Plante superioare | Zaharoză | Trehaloză, glicogen, polioli | Fungi de micorize |

Fenomenul explică fluxul unidirecțional al glucidelor. În cazul în care glucidul respectiv este utilizabil și de algă, asigurarea utilizării predominant unidirecționale este realizată prin conversia rapidă de către partener într-o formă accesibilă numai lui. Astfel, în cazul micorizelor, plantele-gazdă cedează fungilor zaharoză, care este convertită rapid de aceștia la trehaloză și polioli, pe care planta nu îi poate folosi.

Transferul glucidelor este influențat de înfometare sau chiar de diminuarea nutrienților și de pH. La pH 4,5, algele eliberează 85% din $^{14}C$ total fixat ca maltoză, iar la pH>7,5, numai 6—7% și nu ca maltoză, ci ca acid gli-

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

colic. Influențe nutriționale bilaterale cu mecanisme biochimice subtile au fost demonstrate în cazul simbiozei dintre *Rhizobium* sp. și plantele leguminoase.

Transferul de nutrienți sau de factori de creștere a fost evidențiat și în cazul ectosimbiozelor. Astfel, protozoarele ciliate marine prezente pe suprafața corpului la crustaceele marine preiau hrana din curenții de hrană sau respiratori. Stanier și colab. (1970) citează în acest sens cazul protozoarului ciliat peritrih, *Ellobiophyra donacis*, localizat în branhiile bivalvei *Donax vittatus*, studiat de Chatton și Lwoff (1929) (fig. 90).

De asemenea, micorizele ectotrofe, pe lîngă faptul că măresc suprafața de absorbție a sistemului radicular, asigurînd preluarea de către plante a unei cantități crescute de nutrienți, comparativ cu rădăcinile neinfectate, utilizează surse inaccesibile organismelor-gazdă.

Transferul de nutrienți are o mare valoare pentru supraviețuirea gazdelor, în special pentru că le asigură suplimentarea nutrienților cu C, mai ales în cazurile cu deficit nutrițional. După Muscatine și Green (1973), efectul nutrițional al algelor asupra organismului-gazdă este mai important decît cel de modulare a concentrației $O_2$ sau a $CO_2$, ca și decît cel de îndepărtare a substanțelor reziduale. Datorită acestui efect, alga endosimbiotică susține creșterea și viabilitatea gazdei. Ca probă, chiar în condiții de limitare a aprovizionării cu nutrienți, organismele-gazdă care conțin endosimbionți sînt mai viabile decît echivalenții lor aposimbiotici. După Reisser și Wiessner (1984), eliberarea glucidelor din endosimbionți și transferul lor la organismele-gazdă reprezintă un bun exemplu de avantaj selectiv rezultat dintr-o adaptare specială la o anumită nișă ecologică.

**Funcția de protecție.** Frecvent, simbioza conferă protecția cel puțin unuia dintre parteneri în raport cu existența lor individuală. Fenomenul este ilustrat de numeroase exemple:

— Bacteriile din organele excretoare ale unor insecte descompun reziduurile toxice din organismul acestora, în special ureea și acidul uric, la $NH_3$ pe care îl asimilează în cursul metabolismului lor. În mod asemănător, algele endosimbiotice ale nevertebratelor, pe lîngă aportul nutrițional reprezentat de fotosintat, acționează ca sisteme de îndepărtare a reziduurilor, a căror acumulare ar putea deveni toxică pentru gazdă.

— Microbiota normală din intestinul maniferelor joacă un rol complex. În primul rînd, le protejează față de invazia microorganismelor condiționat patogene și chiar patogene, prin competiția la care acestea nu pot rezista. În același timp, au un rol morfogenetic important pentru biologia animalelor respective. Animalele axenice („germ-free") prezintă anomalii anatomice și histologice, modificări degenerative ale unor țesuturi a căror arhitectură revine la normal după infectarea cu microorganismele corespunzătoare.

## SEMNIFICAȚIA ECOLOGICĂ A SIMBIOZELOR

Răspîndirea largă și marea frecvență a relațiilor simbiotice pledează pentru o importanță deosebită a acestui fenomen și pentru rolul său benefic în primul rînd pentru valorificarea eficientă a unor habitate și supraviețuirea partenerilor respectivi.

Dubos și Kessler (1963) semnalează rolul unor factori de mediu în inițierea și/sau menținerea și funcționarea unor simbioze. Astfel, este demonstrat faptul că infectarea plantelor leguminoase cu *Rhizobium* sp. și formarea nodozităților sînt întîrziate de prezența unor concentrații mari de N anor-

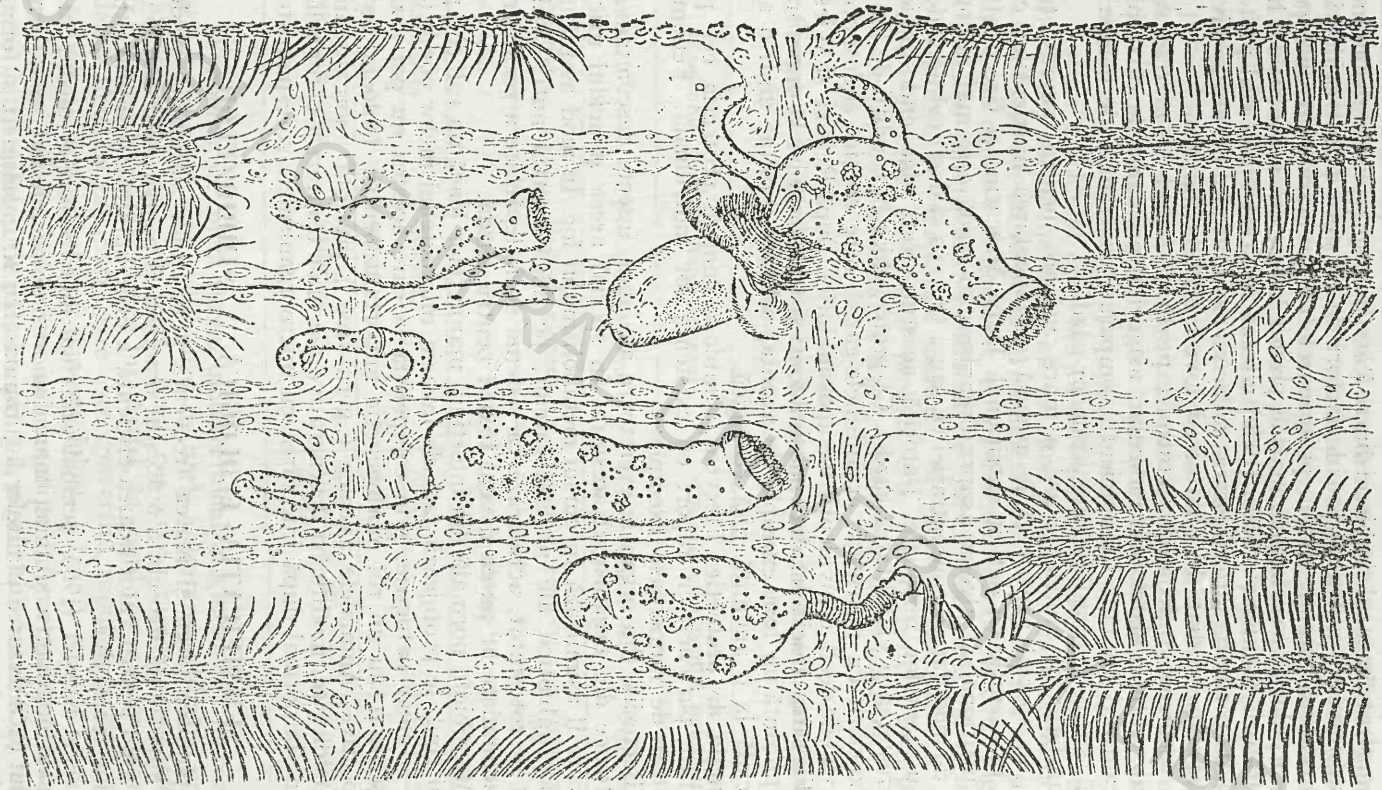


Fig. 90. — Protozoarul ciliat *Ellobiophrya donacis* „legat" de branhiile bivalvei *Donax vittatus*: *a*, un protozoar în curs de reproducere prin înmugurire (după Chatton și Lwoff, 1929).

ganic în sol. De asemenea, formarea micorizelor este inhibată în solurile bogate în nutrienți. În cazul lichenilor, abundența nutrienților suprimă simbioza fungi/alge. În sfîrșit, factorii de mediu pot modifica echilibrul relației simbiotice de la o interacțiune mutual benefică la parazitism: *P. bursaria* își digeră simbiontul algal *(Chlorella)* dacă este menținut la întuneric.

Un caz elocvent pentru ecologia simbiozelor, legat de influența simbionților, este cel al moluștelor gigante și al viermilor vestimentiferi din tranșeele abisale ce înconjură izvoarele termale bogate în sulf: habitatul extrem, nutriția, ca și dimensiunile lor mari sînt determinate de prezența bacteriilor simbiotice chemolitotrofe.

Reisser și Wiessner (1984) consideră că argumentele în favoarea unei necesități fiziologice a simbiozei nu sînt convingătoare. În sprijinul acestei idei, ei citează faptul că, adesea, partenerii simbiotici pot fi separați și cultivați independent în laborator. De asemenea, în cazul simbiozelor necreditare (cînd gazda este transmisă prin reinfectarea la fiecare generație a gazdei aposimbiotice), cei doi parteneri pot persista separat în mediu, uneori timp îndelungat.

Nici cazul sistemelor endosimbiotice ereditare (transferate direct de la o generație la alta prin diviziune) nu este un argument pentru determinismul fiziologic al simbiozei.

Algele simbiotice de la *C. roscoffensis* nu pot competiționa cu cele libere datorită adaptărilor determinate de viața intracelulară îndelungată, respectiv vitezei reduse de creștere și diviziune, și excreției de glucide (fotosintat) în mediu.

După Reisser și Wiessner (1984), simbioza este avantajoasă pentru ambii parteneri nu în primul rînd pentru rațiuni fiziologice, ci, mai ales, pentru cele de ordin ecologic (fig. 91). Ea reprezintă un sistem-tampon, care asigură existența partenerilor în condiții necorespunzătoare din habitatul natural.

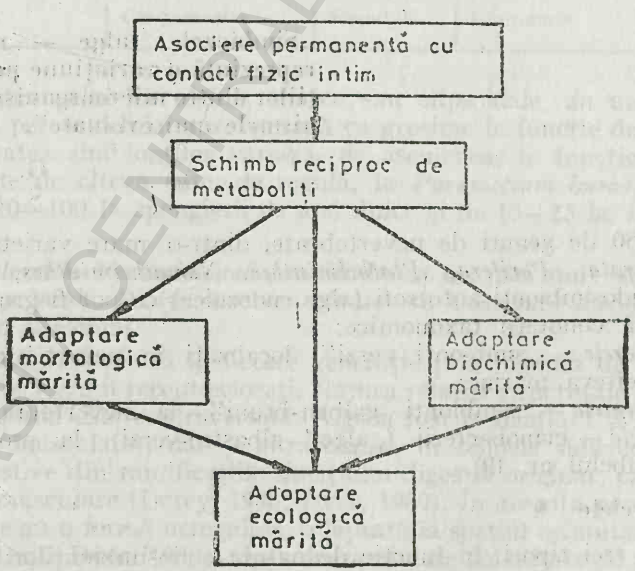



Fig. 91. — Caracteristicile simbiozelor mutualiste dintre autotrofe și heterotrofe (modificat după Lewis, 1974).

BCU IAȘI CENTRUL VECHI LIBRARY

Utilizînd sistemul *Convoluta roscoffensis/Platymonas convolutae*, Gooday și Doonan (1980) consideră că ecologia endosimbiozei alge/nevertebrate poate fi analizată la două nivele:

1) **La nivelul individual** se pune problema „ecologiei interne" a asocierii simbiotice, respectiv a interrelațiilor structurale și metabolice, precum și a factorilor răspunzători de creșterea integrată a celor doi parteneri. După datele lor, un raport:

$$\frac{\text{Proteină algală}}{\text{Proteină gazdă}} = 0{,}04 - 0{,}08$$

este expresia unei creșteri integrate echilibrate, în cursul căreia *C. roscoffensis* se comportă ca un fitofag, care își conține hrana și nu este nevoit să cheltuiască energie pentru a o căuta. Spre deosebire de lanțurile trofice convenționale, în care la fiecare nivel trofic există o pierdere importantă de materie și energie, în acest caz se realizează o reciclare a nutrienților (Smith, 1978).

2) **La nivelul populațional**, simbioza depinde de factorii care influențează dispersia în natură și de modificările în frecvența asociației. În acest sens, sînt de remarcat răspîndirea largă și abundența în mările tropicale, în asociere cu recifurile de corali etc. După Gooday și Doonan (1980), selecția naturală favorizează asocierea în medii sărace în nutrienți și $O_2$, respectiv unde există o mare nevoie de $O_2$ produs prin fotosinteză. În plus, fapt esențial, animalele tropicale au viteze metabolice mai mari decît cele ale echivalenților lor din regiunile temperate și, de aici, nevoile mai mari pentru „serviciile" complementare ale unor parteneri capabili să îndepărteze reziduurile.

## SIMBIOZA MICROORGANISME FOTOTROFE—NEVERTEBRATE

**„Simbiozele alge — nevertebrate reprezintă o variațiune pe tema relațiilor dintre microorganisme cu organismele mai evoluate".**

G. W. Goody
S. A. Doonan

Peste 150 de genuri de nevertebrate, dintr-o mare varietate *(Protozoa, Coelenterata, Porifera, Plathelminthes, Nemathelminthes, Mollusca)*, adăpostesc endosimbionți autotrofi (alge endozoice) ce pot fi grupați în trei categorii, fără conotații taxonomice:

1) *Zooclorele* — „simbionți verzi", localizați în nevertebrate de apă dulce și în cîteva marine;

2) *Zooxantele* — „simbionți galben-bruni", la nevertebrate marine:

3) *Cianele* — cianobacterii („alge" albastre-verzi), la protozoare de apă dulce (tabelul nr. 19).

### Zooclorelele

Sînt de trei tipuri, în funcție de natura endosimbienților:

— *Zooclorelele-Chlorococcales* sînt prezente la protozoare, spongieri, hidre și viermi plați *(Turbellaria)*.

*Tabelul nr. 19*

**Asociații simbiotice între bacterii, alge și nevertebrate**
(modificat după Smith, Muscatine și Lewis, 1969)

| Simbiontul | | | Gazdele animale | Habitatul |
|---|---|---|---|---|
| Clasa | Ordinul | Forma simbiontului | | |
| | | *ZOOCHLORELLAE* | | |
| 1. *Chlorophyceae* | *Chlorococcales* | Cocoidă | Protozoare, spongieri, hidre, viermi plați | Apă dulce |
| 2. *Prasinophyceae* | *Pyramimonadales* | Neregulată | Turbelariate, acelomate, viermi plați | Marin |
| 3. *Chlorophyceae* | *Siphonocladiales* | Cloroplaste | Moluște opistobranhiate | Marin |
| | | *ZOOXANTELLAE* | | |
| 1. *Dinophyceae* | *Peridiniales* | Cocoidă | Spongieri, celenterate, moluște | Marin |
| 2. *Bacillariophyceae* | *Bacillariales* | Cocoidă | Turbelariate acelomate, viermi plați | Marin |
| | | *CYANELLAE* | | |
| 1. *Cyanobacteria* | *Chroococcales* | Variabilă | Protozoare | Apă dulce |

Majoritatea celulelor algale, sferice sau elipsoidale, au un cloroplast pirenoid și un perete celular care variază ca grosime în funcție de natura cuplului. Densitatea simbionților variază, de asemenea, în funcție de natura asociației. Este de cîteva sute, de regulă, la *Paramecium bursaria* (limitele 1—1000), de 10—100 la spongierii de apă dulce și de 15—25 la *Hydra viridissima*.

— *Zoochlorelele-Pyramimonadales.* Simbioza cel mai mult studiată este cea dintre alga verde *Platymonas convolutae* cu *Convoluta roscoffensis*, turbelariat marin acelomat.

Simbioza se instalează la fiecare generație prin ingestia de alge libere, mobile, de către viermii recent eclozați. Natura relației structurale dintre celulele algale și gazdă este controversată. Alga a fost evidențiată și intercelular (între celulele musculare), dar și intracelular, în celulele subepidermale, în vacuolele digestive din ramificațiile sincițiului digestiv originar, care pătrund între celulele musculare (Dorey, 1980; Dyer, 1989). În absența peretelui celular rigid, algele au o formă neregulată, adaptată la spațiul delimitant din celulele animale. După Dyer (1989), algele intracelulare delimitate de propria lor membrană plasmatică sînt acoperite de o membrană vacuolară și, final, de membrana celulei-gazdă.

Asociația este importantă pentru că reprezintă singura asociație alge/metazoare în care gazda nu mai ingeră hrana după stabilirea simbiozei. Alga furnizează gazdei aminoacizi, amide, acizi grași, steroli și $O_2$, iar animalul îi cedează $CO_2$ și acid uric. În felul acesta, simbioza se constituie ca un lanț trofic „comprimat", închis și eficient, în care cei doi parteneri fac un schimb mutual benefic de N, C, $O_2$ și P, în care fiecare sintetizează anumite forme chimice utilizate de celălalt partener (fig. 92).

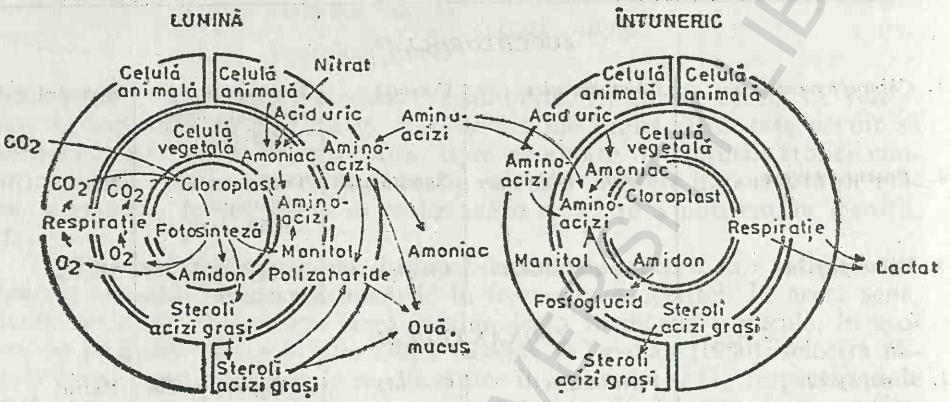



Fig. 92. — Relațiile metabolice de tip mutualist dintre *Convoluta roscoffensis* și *Platymonas convolutae*. Figura evidențiază modificările în metabolismul carbonului la lumină și la întuneric. *Platymonas* furnizează $CO_2$ și $NH_3$ de la acid uric. La lumină, alga produce $O_2$ și carbon organic care sînt folosite de *Platymonas* (după Holligan și Gooday, 1975).

*C. roscoffensis* este un producător primar foarte eficient. După Gooday și Dyer (1980), în expunere solară avantajoasă, fixează 872,9 g C per $m^{-2}/an^{-1}$ de colonie.

La nivel populațional, fenomenul este lipsit de importanță în rețeaua trofică, deoarece sintetizează trimetil-amină care are efect repelent pentru prădători.

La nivel individual, în „ecologia internă" a asociației, datorită interrelațiilor structurale și metabolice, și factorilor răspunzători de creșterea integrată a gazdei și a simbionților, nevertebratul poate fi considerat ca un fitofag care poartă hrana în structura sa și nu cheltuiește energie ca să o caute. Spre deosebire de lanțurile trofice uzuale, în care există o pierdere de N la fiecare verigă, lanțul său trofic închis asigură reciclarea nutrienților (Bougis, 1976).

— *Zoochlorelele-Cloroplaste*. Descrisă mai ales la gasteropode opistobranhiate (Ord. *Sacoglossa*, fam. *Elysiidae)*, asociația conține simbionți cu structură de cloroplaste respectiv ca pachete interne cu structuri lamelare de tipul tilacoizilor.

Ele conțin pigmenți similari celor din cloroplastele tipice și fixează la lumină $^{14}CO_2$ (Dyer, 1989).

### Zooxantelele

Sînt simbionți descriși inițial de Brandt (1881), colorați în galben-brun datorită pigmenților caracteristici. Ei fac parte, de regulă, din clasa *Dinophyceae (Peridiniales)* și excepțional din *Bacillariophyceae* (fig. 93). Gazdele uzuale sînt protozoare *(Porifera), Coelenterata, Plathelminthes* și *Mollusca.*

Dintre cele mai studiate sisteme sînt: *Cassiopeia* sp. cu simbiontul *Symbiodinium microadriaticum* și respectiv *Convoluta paradoxa (C. convoluta)* cu diatomeea *Licmophora hyalina.*

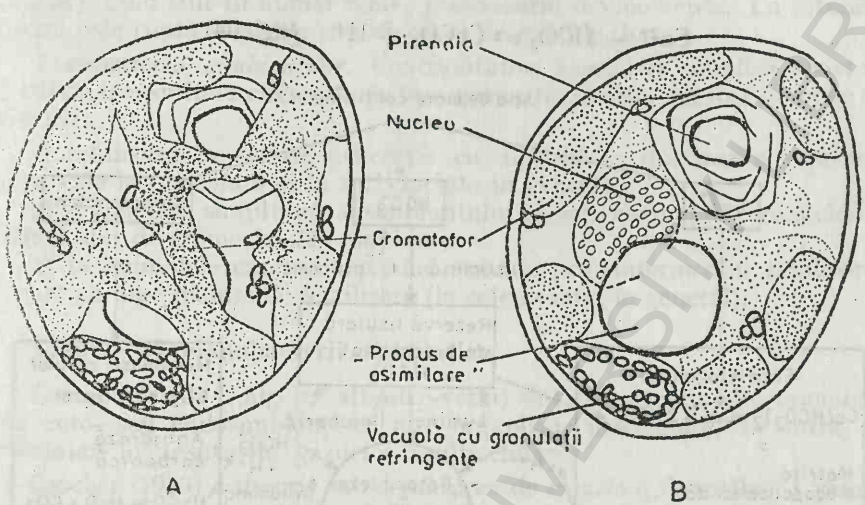



Fig. 93. — Zooxantele la *Anemonia sulcata*. A. Vedere de suprafață. B. Secțiune la microscopul fotonic (după Droop, 1963).

Zooxantelele sînt mai abundente la unele nevertebrate marine din regiuni temperate, tropicale și polare.

Prezența lor este limitată la zona fotică (respectiv pînă la adîncimea de 80 m. Au fost evidențiate și la adîncimi mai mari (200—380 m) în asociere cu anemonele de mare și coralii, probabil trăind ca heterotrofe pe aceste gazde. Tulpinile respective nu pot fi cultivate la întuneric și nici nu pot supraviețui mai mult de două luni la întuneric.

În apele tropicale, zooxantelele au o mare importanță ecologică datorită funcției lor de constructori ai recifurilor de corali.

*Rolul zooxantelelor în calcificarea recifurilor de corali.* Spre deosebire de coralii solitari (lipsiți de alge simbiotice), care cresc lent și individual, coralii care formează recifuri extinse au o creștere rapidă, în care un rol esențial revine activității respiratorii și fotosintetice a dinoflagelatelor simbionte (Goreau și Goreau, 1961). Ei pot conține pînă la 30 000 de zooxantele/mm$^3$, reprezentînd 5% din biomasa algală (restul sînt alge care trăiesc *în* sau *pe* scheletul coralilor). Recifurile de corali reprezintă un mediu fiziologic și nutrițional adecvat pentru dezvoltarea populațiilor sinergice de dinoflagelate endozoice, care trăiesc în țesuturile polipilor coralieni. Ele le conferă acestora capacitatea de răspuns fototactic, asigurînd extinderea lor în direcția luminii celei mai intense, favorabilă pentru fotosinteză.

Depunerile de calciu efectuate, în special în cursul perioadelor de maximă fotosinteză a algelor sînt controlate de enzima anhidraza carbonică tisulară, care catalizează reacția: $H_2CO_3 \rightleftharpoons H_2O + CO_2$. În absența algelor simbiotice și în întuneric, depunerea de Ca este extrem de redusă datorită intervenției unor inhibitori.

Prezența algelor modifică valoarea de pH tisular și echilibrul dintre bicarbonat (solubil) și carbonat (mai puțin solubil). Depunerea de $CaCO_3$ ca aragonită de la $HCO_3$ are loc după reacția:

$$Ca^{2+} + HCO_3 \rightleftharpoons CaCO_3 + H^+ \quad \text{(fig. 94)}$$

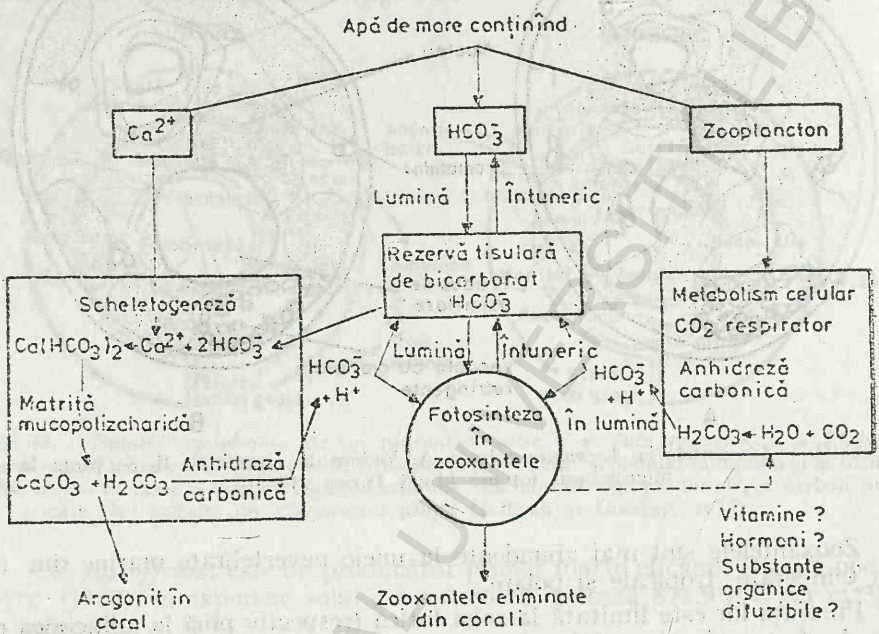



Fig. 94. — Căile posibile de calcificare în recifurile de corali corelate cu activitatea fotosintetică și respiratorie a zooxantelelor (după Goreau, 1961).

Raportul cantității de Ca în lumină față de întuneric este de 10:1.

În afară de rolul decisiv în evoluția coralilor prin mărirea vitezei de depunere a calciului, zooxantelele au și alte efecte adiționale:

1) stimulează creșterea masei acestora prin furnizarea de materie organică rezultată din fotosinteză;

2) exercită un rol antitoxie prin îndepărtarea $NH_3$, împiedicînd acumularea acestuia în țesuturile gazdei.

**Localizarea simbionților algali în nevertebrate** poate fi intra- sau intercelulară.

La *P. bursaria*, *Stentor polymorphus* și *H. viridissima* au fost descrise două tipuri de vacuole:

1) *Vacuole perialgale*, care conțin o singură celulă algală al cărui perete este strîns legat de membrana vacuolei sintetizată de celula-gazdă. Ele se divid simultan cu alga inclusă, pe care o apără de enzimele litice ale gazdei.

2) *Vacuole digestive* cu mărime variabilă care conțin bacterii și alge în diferite stadii de degradare. La metazoare, algele sînt localizate în celule specifice sau în regiuni specifice ale corpului. Astfel, la *H. viridissina*, algele sînt localizate specific în celulele gastrodermale. Dacă se excizează porțiuni

din gastrodermă, care refac organismul întreg, celulele care se dediferențiază și apoi devin celule ectodermale își pierd invariabil simbionții. Algele pot ocupa un procent ridicat din biomasa gazdei (~10—56% respectiv ~3000 alge per protozoar). Cînd sînt în număr mare, protozoarul devine verde. La întuneric, simbioza este ruptă și algele sînt digerate de gazdele lor.

*Transmiterea simbionților.* Continuitatea asociației implică existența unei căi de transmitere eficientă, de la o generație la alta. Au fost descrise mai multe căi:

1) reinfecția la fiecare generație cu alge libere din mediu reprezintă singura cale la *Convoluta* și la turbelariate în general;

2) diviziunea simultană a simbiontului și segregarea între celulele-fiice rezultate din diviziune la *Paramecium;*

3) la animalele care se reproduc sexuat, prin intermediul celulelor-ou infectate cu alge înainte de fertilizare (la celenterate, în general).

### Cianele și cianobacterii simbiotice

Cianobacteriile („algele" albastre-verzi) sînt asociate cu alte organisme, fie ca ecto- sau endosimbionți cu alte organisme unicelulare, fie intra- sau intercelular în țesuturile gazdelor multicelulare.

Pascher (1929) a descris sub denumirea de *cianele* („Cyanellae") primele asociații simbiotice dintre cianobacterii și unele protozoare și alge de apă dulce. El a propus denumirea de *sincianoză*, pentru relația simbiotică, iar pentru asocierea individuală pe cea de *cianom.*

Geitler (1959), precum și Reisser (1984) consideră că termenul de cianele trebuie limitat la cianobacteriile unicelulare care trăiesc endosimbiotic. Cianobacteriile filamentoase, ca și cele localizate inter- sau extracelular sînt numite mai corect *cianobacterii simbiotice.* Termenul de zoocianele este nerecomandat.

Organismele-gazdă aparținînd regnului vegetal sau animal sînt unicelulare sau multicelulare și pot fi grupate în funcție de natura interacțiunii în două categorii:

1) *Gazde fotosintetizante*, în care activitatea fotosintetică a cianobacteriilor este foarte slabă, funcția lor majoră fiind de fixare a $N_2$ (vezi cap. *„Simbioza"*).

2) *Gazde apoplastidiale* la care cianobacteria furnizează fotosintat și puțin sau chiar deloc $N_2$ fixat (tabelul nr. 20).

Există o singură asociație de **cianobacterii—fungi** între *Nostoc sphaericum*, inclus într-un înveliș derivat din plasmalema fungilor-gazdă și *Geosiphore pyriforme (Phycomycetes).*

**Simbioza diatomee—cianobacterii** este importantă, deoarece însumează în aceeași celulă două unități fotosintetice diferite. A fost studiată, în special, la *Rhopalodia gibba* și *R. gibberela*, care adăpostesc 1—5 cianele/celulă, învelite cu membrane individuale.

O mare varietate de briofite adăpostesc cianobacterii simbiotice *(Nostoc sphaericum, N. calcicola)* intracelular, în cavități speciale situate pe partea ventrală a gametofitului, în care pătrund prin stomate sau pori speciali. Cavitățile sînt pline cu mucus produs, probabil, de bacterii și cu filamente multicelulare generate de planta-gazdă.

*Tabelul nr. 20*

**Cianele și cianobacterii simbiotice în gazde uni- și pluricelulare** (după Reisser, 1984)

| Genuri și specii gazdă | Cianobacteria simbiotică | Habitatul |
|---|---|---|
| GAZDE UNICELULARE | | |
| *Phycomycetes* * | | |
| *Geosiphon pyriforme* | *Nostoc sphaericum* | (I) în vacuole |
| **Diatomee** | | |
| *Denticulata vanheurcki* | | |
| *Epithemia turgida* | Cianele | Apă dulce |
| *Rhopalodia gibba* | | |
| *Epithemia zebra* | | |
| *Rhizosolenia* | | |
| **Rhizopode** | | |
| *Paulinella cromatophora* | Cianele | ? |
| **Protiste apoplastidiale** | | |
| *Cyanophora paradoxa* | Cianele(*Cyanocyta korshikoffiana*) | (I) |
| *Glaucocystis nostochinearum* | Cianele (*Skujapeltanuda*) | (I) dispuse radiar sau aleatoriu |
| GAZDE PLURICELULARE | | |
| **Clorophyceae** | | |
| *Oedogonium* | ? | (I) în oogonii |
| *Codium bursa* | *Phormidium* | |
| **Bryophyta** | | |
| *Anthoceros* | *Nostoc sphaericum* | În cavitățile ventrale ale gametofitului (E) |
| *Blasia pusilla* | *Nostoc calcicola* | (E |
| *Cavicularia* | *Anabaena* | În celulele hialine |
| *Sphagnum* | *Nostoc* sp. | (E) |
| | *Hapalosiphon* | |
| **Pteridophyta** | | |
| *Azolla* | *Anabaena azollae* | (E) în cavitățile frunzelor |
| **Gymnospermae** | | |
| *Cycas* | *Nostoc punctiforme* | (I) și (E); la *Macrozamia* în rădăcinile coraloide |
| *Encephalartos* | *Noston cycadeae* | |
| *Zamia, Macrozamia* | *Anabaena* | |
| **Angiospermae** | | |
| *Gunnera* | *Nostoc punctiforme* | (I) în nodozități |
| *Tripholium alexandrinum* | *Nostoc punctiforme* | |
| **Porifere** | | |
| *Calcarea* | *Aphanocapsa* | (I) în vacuole și (E) |
| *Demospongiae* | *Phormidium* | (E) |
| **Echiurida** | | |
| *Bonellia fuliginosa* | ? | (I) în celulele specializate ale țesutului epidermic |
| *Ikedosoma gogoshinense* | | |
| **Tunicata** | | |
| *Didemnum* | *Prochloron didemni* | (E) în cavitatea cloacală și în pliurile din jurul orificiului cloacal |

I = intracelular; E = extracelular; ? = specie nedeterminată

* Miceliu format din numeroși nuclei, într-o masă comună de citoplasmă. Hife neseptate sau numai rar septate.

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

**Simbioza cianobacteriilor cu protozoarele.** Cianobacteriile pot avea cu protozoarele fie relații de asociere întîmplătoare, pe suprafața externă (ectosimbioză), fie relații de endocianoză.

Primul tip de relație este ilustrat de asocierea cianelelor de capsula gelatinoasă a unui flagelat, *Oichomonas syncyanotica.*

În sistemele endosimbiotice, cianelele sferice sau bacilare au o morfologie asemănătoare formelor libere, însă prezintă modificări marcate ale peretelui celular (de la reducerea straturilor acestuia pînă la absența totală. În general, celulele conțin, pe lîngă tilacoizi aranjați concentric, și ficobilisomi, granulații de polifosfat, corpi electronoopaci cu forme și mărimi diferite, analogi, probabil, carboxisomilor.

*Peliaina cyanea* conține 1—6 cianele asemănătoare cu *Synechococcus.* aranjate subparietal (fig. 95). Simbioza se menține, în general, echilibrată deși au fost semnalate și protozoare fără simbionți.

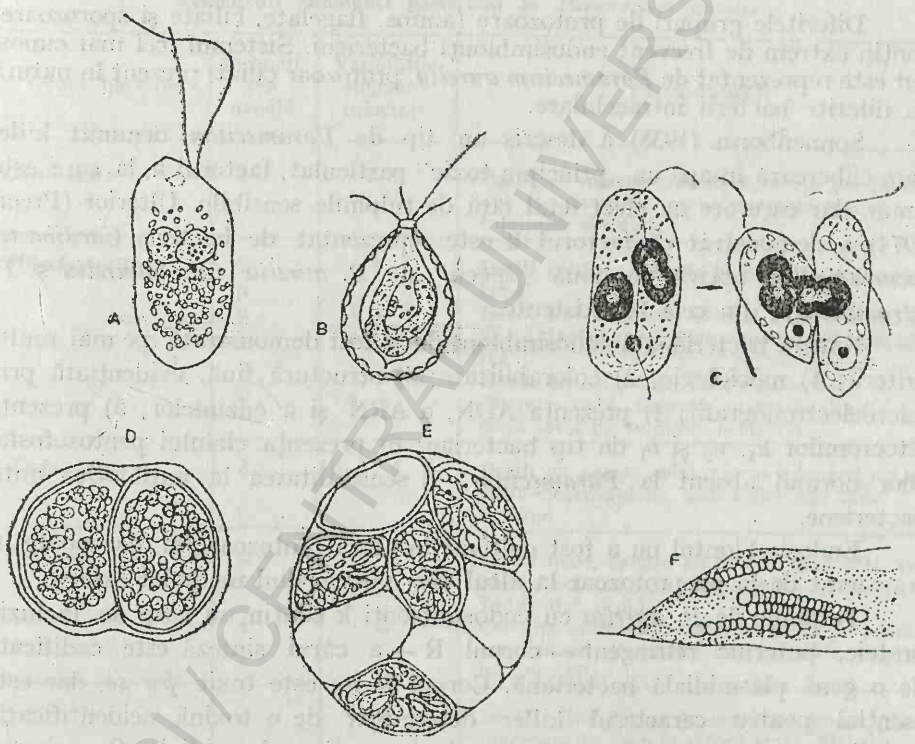



Fig. 95. — Protiste cu cianobacterii simbiotice : **A.** *Peliaina cyanea* Pascher. **B.** *Paulinella chromatophora* Lauterby. **C.** *Cyanophora* cu endosimbionți în curs de diviziune și transmitere la descendenți. **D.** *Cyanoptysche gloeocystis* Fescher. **E.** *Glaucocystis nostochinearum.* **F.** *Rhizosolenia* sp. conținînd *Richelia intracellularis* (după Fogg, 1973).

*Cyanophora paradoxa* conține cianele *(Cyanocyla korschikoffiana)* la care lipsesc atît peretele celular, cît și vacuolele de depozit și heterochiștii, prezenți la formele libere.

Protozoarele asigură protecția, mobilitatea, o sursă de $CO_2$ și poate unii factori de creștere, în timp ce cianobacteriile le furnizează C organic (fotosintat), $O_2$ și capacitatea de răspuns fototactic.

Există o diferență fundamentală în integrarea sincianozelor în gazdele auto- și heterotrofe (Reisser, 1984). În primul caz, cianelele funcționează ca unități metabolice fixatoare de $N_2$, care pot fi de regulă separate de gazde și cultivate independent. În gazdele heterotrofe însă, ele acționează ca unități fotosintetizante și integrarea morfologică și metabolică este mult mai mare. La *Cyanophora paradoxa*, cei doi parteneri cooperează chiar în biosinteza clorofilei și a tilacoizilor. Acest fenomen explică de ce după omorîrea cianelelor cu antibiotice, gazda nu poate compensa lipsa lor prin resinteză pe seama substanțelor din mediu (Trench, 1982).

## ENDOSIMBIONȚII BACTERIENI AI PROTOZOARELOR

Diferitele grupuri de protozoare (amibe, flagelate, ciliate și sporozoare) conțin extrem de frecvent endosimbionți bacterieni. Sistemul cel mai cunoscut este reprezentat de *Paramecium aurelia*, protozoar ciliat, prezent în natură cu diferite bacterii intracelulare.

Sonnenborn (1938) a descris un tip de *Paramecium* denumit killer care eliberează în apă un „principiu toxic" particulat, factorul k, la care este imun, dar care are un efect letal față de tulpinile sensibile. Ulterior (Preer, 1974) a demonstrat că factorul k este reprezentat de bacteria *Caedibacter taeniospiralis*, activă pe două „specii" de *P. aurelia* (*P. biaurelia* și *P. tetraaurelia*), din cele 14 existente.

Natura bacteriană a endosimbiontului a fost demonstrată pe mai multe criterii: 1) morfologie; 2) colorabilitate; 3) structură fină, evidențiată prin microelectronografii; 4) prezența ADN, a ARN și a enzimelor; 5) prezența citocromilor $a_1$, $a_2$ și $b_1$ de tip bacterian; 6) prezența ciclului pentozofosfaților normal absent la *Paramecium;* 7) sensibilitatea la antibiotice antibacteriene.

Endosimbiontul nu a fost cultivat în afara protozoarului, dar poate fi transferat de la un protozoar la altul prin intermediul mediului extern.

Tulpinile de *P. aurelia* cu endosimbionți k conțin un corp de incluzie proteic, puternic refringent — corpul R — a cărui sinteză este codificată de o genă plasmidială bacteriană. Corpul R nu este toxic *per se*, dar este esențial pentru caracterul killer determinat de o toxină neidentificată, sintetizată sub controlul aceleiași regiuni genetice plasmidiale. Capacitatea tulpinilor de *P. aurelia* de a elibera factori k este controlată genetic de citoplasmă și nu de nucleu. Ca urmare, dacă un protozoar k se conjugă cu unul sensibil (cu schimb de citoplasmă), acesta devine el însuși killer.

Nu se cunoaște natura substanței k și nici mecanismul „imunității" tulpinilor k de *Paramecium*. După înglobarea unuia sau a mai multor factori k sau a derivaților lor, *P. aurelia* suferă sensibil procese de vacuolizare,

paralizie și moarte. Moartea seamănă cu cea produsă de colicine, cu excepția faptului că acestea sînt active tot pe bacterii, în timp ce factorul k omoară protozoarele.

Viteza de creștere a endosimbionților bacterieni variază cu temperatura și cu concentrația nutrienților, și nu este obligatoriu aceeași cu cea a gazdei. De aceea, numărul endosimbionților/protozoare poate varia de la zero la cîteva sute.

În anumite condiții de laborator, tulpinile de *P. aurelia k* au un avantaj competitiv față de cele neinfectate. În alte condiții, situația este inversă.

În ultimii ani au fost descriși mai mulți endosimbionți bacterieni la *P. aurelia* (tabelul nr. 21). Cel mai mult studiați sînt simbionții μ, γ și α.

*Tabelul nr. 21*

**Principalii simbionți bacterieni la *Paramecium aurelia***

| Genul bacteriei | Denumirea uzuală | Varietățile singenice infectate | Particularități |
|---|---|---|---|
| *Caedibacter* | k | 2,4 | Bacili cu mărime variabilă; corpi de incluziune R; paralizia, vacuolizarea și moartea tulpinilor sensibile |
| *Pseudocaedibacter* | Pi | ? | Bacili subțiri; netoxic și neletal; mutantă kapa |
| | μ | 1, 2, 8 | |
| | μ | 1, 2. 8 | Bacili fini, alungiți; efectul letal condiționat de contactul intercelular asociat cu conjugarea |
| | ν | 1, 2, 5 | Bacili fini, alungiți, fără efect toxic |
| | γ | 8 | Bacterie mică, dispusă uneori în diplo; efect letal pe tulpinile sensibile |
| *Tectobacter* | δ | 1, 2, 4, 6 | Bacili cu perete celular gros acoperit de un strat electron-dens, slab killer sau fără acțiune |
| *Lyticum* | λ | 4, 8 | Bacili mari, drepți, cu flageli peritrichi, probabil imobilizați în citoplasmă. Induc liză rapidă. |
| | 4 | 2 | Cel mai mare endosimbiont de la *P. aurelia*, bacil incurbat; induce liza rapidă a tulpinilor sensibile. |
| ? | α | 2 | Bacilar sau formă de semilună prezent în macronucleu, rar în citoplasmă. Macronucleul mediu favorabil pentru bacterie. |

Nu se cunosc interacțiunile din acest tip de simbioză. În cazul unor flagelate tripanosomide *(Crithidia* sp.), endosimbiontul ar furniza gazdei unii aminoacizi esențiali (lizină, metionină), hemină, factori de creștere și vitamine.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

## SIMBIOZA MICROORGANISME — INSECTE

**„Relația dintre microorganisme și insecte este atît de veche și are, uneori, o natură atît de intimă, încît, în multe cazuri, procesele determinate pot fi mai asemănătoare celor efectuate de organitele celulare decît cele ale unor bacterii independente"**

M. A. BROOKS

Ca și alte organisme, insectele și acarienii sînt adesea asociate cu diferite microorganisme: bacterii, microfungi sau protozoare. Ele pot prezenta diferite grade de asociere, de la simpli contaminanți din mediu, adăpostiți temporar, la asocieri ectosimbiotice constante, localizate în structuri specializate de tipul invaginărilor sau al unor regiuni dilatate (apendice sacciforme), deschise în lumenul extremității posterioare a intestinului mijlociu sau ca endosimbiont complet izolat.

Mamaev (1977) a descris primul tip de simbioză sub denumirea discutabilă de *endosimbioză extracelulară*, iar cel al microorganismelor localizate în celule sau organite diferențiate specifice (micetoame) sub denumirea pleonastică de *endosimbioză intracelulară*.

În aceste procese sînt implicate multe categorii de insecte și acarieni. Cel mai mult studiate, pentru rațiuni de ordin practic, sînt cele hematofage, care au posibilitatea de a transmite agenți patogeni pentru om și animale, cele care pot vehicula agenți fitopatogeni și cele dendrofile, care sînt localizate în scoarță și în lemnul arborilor, depreciindu-l calitativ. Deși simbioza dintre microorganisme/insecte sau acarieni este deosebit de importantă din punct de vedere teoretic și practic este relativ puțin studiată, reprezentînd unul dintre domeniile cel mai puțin dezvoltate ale microbiologiei insectelor*.

Prezența microorganismelor simbiotice este foarte răspîndită mai ales la organismele care se hrănesc cu alimente incomplete de-a lungul întregului lor ciclu de viață. În categoria acestora sînt incluse: seva plantelor (săracă în N), cerealele depozitate și lemnul (bogate în lignină, celuloze, hemiceluloze și sărace în N), lîna, părul și penele (bogate în keratină și sărace în vitamine), sîngele și serul sanguin al omului și al animalelor (deficitar în vitamine B) etc.

Simbionții sînt absenți la insectele hematofage cu metamorfoză completă, care, fiind omnivore în stadiul larvar și hrănindu-se cu diferite resturi organice, celule de microorganisme sau excrete de animale, stochează cantități importante de vitamine și factori de creștere pe care le pot utiliza în diferite faze reproductive. Ca urmare, flebotomii, țînțarii, simuliidele etc. nu conțin microorganisme simbiotice. Face excepție *Culex pipiens fatigans*, care poartă simbionți intracelulari, probabil de tip *Rickettsia*, în mod constant, în intestinul mijlociu. Cauza acestei abateri de la normal nu este

* Denumirea de Microbiologia insectelor nu este corectă din punctul de vedere al sistematicii organismelor-gazdă, care pot fi nu numai insecte, ci și acarieni. Ea este intrată în uz și acceptată în mod convențional pe plan internațional.

cunoscută. Prin contrast, insectele hematofage cu metamorfoză incompletă (*Pediculus*, *Cimex* sp., musca tsetse, căpușele și acarienii) au, toate, simbionți în stadiul de nimfă, deși intestinul lor este steril (Brooks, 1964).

### Localizarea endosimbionților

Endosimbionții sînt localizați în celule specializate, mari sau chiar gigante, cu înalt grad de poliploidie, numite *bacteriocite* cînd conțin bacterii sau *micetocite* cînd conțin levuri.

Ele pot fi izolate și dispersate sau pot forma structuri diferențiate prin gruparea lor în *micetoame*, cu funcția specializată de adăpostire a simbionților.

Localizările micetocitelor și a micetoamelor sînt foarte variate, în funcție de natura organismelor-gazdă (fig. 96).

În unele cazuri, micetocitele sînt localizate în epiteliul intestinal, în care caz simbionții pot fi eliminați continuu în lumen. La alte insecte, micetocitele sînt separate complet de epiteliul intestinal, fiind conținute în țesutul mezodermal subiacent, uneori în tot corpul. La gîndaci și la homoptere, micetocitele sînt răspîndite la întîmplare într-un țesut normal ca, de exemplu, în peretele intestinului mijlociu sau inclavate în corpul gras (un țesut lax discontinuu, situat de-a lungul cavității corpului) (fig. 97) (Buchner, 1955; Lanham, 1968). În alte cazuri, micetocitele sînt detașate de intestin ca structuri independente în cavitatea generală.

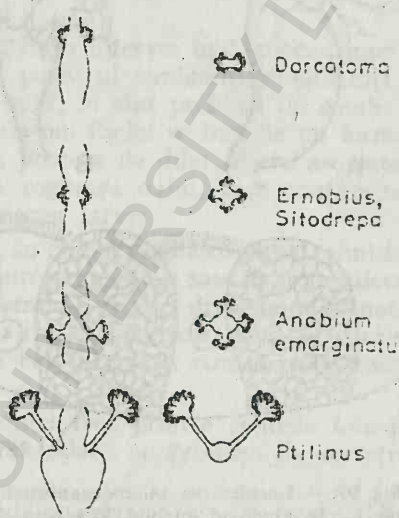



Fig. 96. — Localizarea microorganismelor endosimbionte la *Anobiidae*. Figura reprezintă schematic etapele de dezvoltare evolutivă, ca organe independente, a structurilor în fund de sac, derivate din sistemul digestiv, la mai multe specii de gîndaci (după Koch, 1954).

Un caz particular a fost semnalat la unele *Curculionidae (Apion pisi)* la care doi, din cei șase tubuli malpighieni, s-au transformat adhoc din organe normal excretoare, devenind micetoame, sub forma unor distensii globulare (fig. 98). La alte *Curculionidae (Hylopins* sp.), micetomul complet separat de epiteliul intestinal, localizat în țesutul mezodermal, înconjură ca o centură intestinul mediu în porțiunea sa anterioară.

Au fost semnalate și cazuri de localizări multiple:

La *Cimex lectularius*, endosimbionții sînt localizați în micetoame perechi, alb-strălucitoare lîngă lobii grași, în al treilea segment abdominal la ♀ și de-a lungul vaselor deferente la baza testiculelor la ♂.

Simbionții mici, pleomorfi, cocoizi, diplococoizi, bacilari, lanceolați sau chiar filamentoși, descriși sub denumirea de *Rickettsia lectularia (Symbiotes lectularius)*, sînt prezenți și în căile alimentare, tubulii malpighieni, în

organele sexuale accesorii, ca și în gonade. În embrioni, ei se acumulează ca agregate sferice, care formează micetoamele generației următoare (Brooks, 1972).

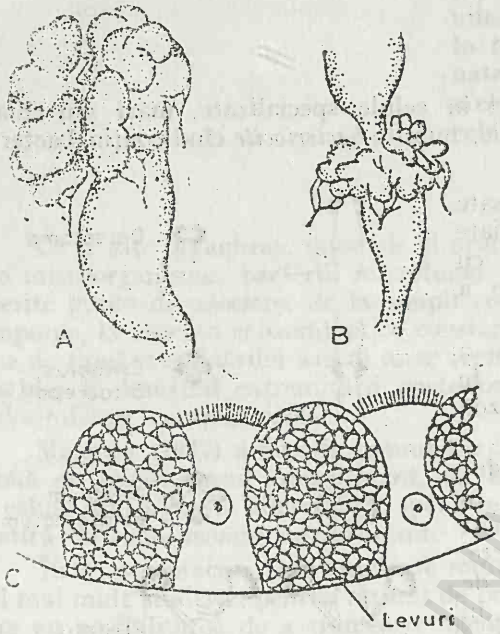



Fig. 97. — Localizarea microorganismelor simbiotice la gîndacul anobiid *Sitodrepa panicea*. A. Larvă, B. Adult. C. Structuri în fund de sac localizate la nivelul intestinului mijlociu al larvei, evidențiind micetocite pline cu microorganisme levuriforme, separate de celule sterile cu marginea în perie (după Koch, din Stanier, 1970).

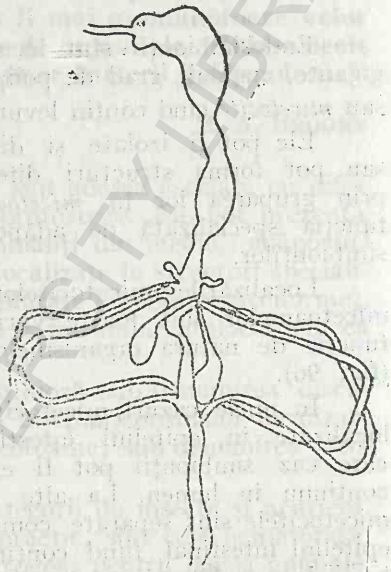


Fig. 98. — Reprezentarea schematică a sistemului digestiv de la adulți dă *Apion pisi*. Schema evidențiază transformarea a doi din cei șase tubi malpighieni în micetoame, sub forma unor distensii globulare (după Koch, 1954).

La căpușe, simbionții sînt localizați în tubulii malpighieni și în ovare. Sînt mici, bacilari sau granulari, aranjați în șiraguri sau în lanțuri dispuse vertical pe baza celulelor din tubulii malpighieni. Trecerea în ovar permite infecția oocitelor.

### Mecanismele de transmitere a simbionților

Acestea sînt diferite și corelate cu localizările lor anatomice și/sau cu modificările comportamentale ale gazdei.

În cazul insectelor la care micetocitele sînt în contact direct cu sistemul digestiv, în momentul depunerii pontei, femelele care depun ouă exsudează cîteva picături de materii fecale bogate în simbionți. Larvele recent eclozate, ca și insectele tinere se infectează *per os*, preluînd simbionții depuși în apropierea sau pe suprafața ouălor.

Au fost descrise și unele adaptări specifice, precum sînt cele descrise la *Coptosoma scutellatum*, care, în momentul pontei, depune mici pachete de

bacterii simbiotice în capsule produse printr-un proces de secreție din intestin, în general, între două perechi de ouă. Larvele tinere se infectează imediat după ecloziune, perforînd peretele capsulei și ingerînd bacteriile din interior (fig. 88).

Simbionții localizați în lumenul intestinal sau cei prezenți în invaginări cu conexiuni intestinale pot contamina ouăle prin eliminarea ouălor simultan cu materiile fecale sau prin etalarea bacteriilor pe suprafața lor în regiunea anală ca la *Pentatomidae*.

În alte cazuri există conexiuni directe din intestin prin canale care comunică direct cu aparatul ovipozitor.

În cazul simbionților detașați de intestin intervin însă mecanisme mai complicate ca, de exemplu, transportul pasiv al simbionților eliberați din micetocite la ovar pe calea limfei. La ovar, ei sînt preluați de celule epiteliale speciale și transferați final la celula-ou. Ciclul se încheie cu formarea micetomului plin cu endosimbionți, prin procese de diferențiere asociate cu o serie de diviziuni normale inițiate în regiunea oului, care conține masa de simbionți, și care, final, duc la formarea larvei.

La cerambicide, anobiide și siricide, în cursul stadiului pupal, simbionții intestinali migrează din intestin în sacii intersegmentali sau în zone adecvate ale tractului genital femel (receptacul seminal, vagin, diverticule situate la baza ovipozitorului etc.). Din această localizare, simbionții trec pe chorionul ouălor, iar larva se contaminează după eclozare prin consumarea acestuia (Mamaev și Danilevski, 1975).

La curculionide și scolitide, simbionții trec printre celulele foliculare și pătrund în ou printr-un pol al acestuia odată cu produșii de secreție ai unor celule cu funcții trofice.

În cazul infecțiilor timpurii ale celulelor germinative, în cursul dezvoltării embrionare, oul conține un număr mare de microorganisme. Pe măsură ce insecta se maturează ca mascul, celulele germinative devin testicule și simbionții din organele mascule se dezintegrează. În cazul în care maturarea evoluează în sensul unui organism femel, simbionții se multiplică în așa fel încît celulele-ou conțin numeroși simbionți.

### Ectosimbiozele dintre microfungi și insecte

Capacitatea insectelor xilofage de a se dezvolta pe seama substratelor lemnoase (cu mare deficit de proteine, steroli și vitamine) este condiționată de asocierea lor cu unele microorganisme, în special levuri și mucegaiuri. Între microorganisme și aceste insecte se stabilesc relații cu caracter reciproc benefic, cu diferite grade de interdependență, care, în forme variate, fie favorizează utilizarea materialului lemnos, fie furnizează acestor insecte biomasă microbiană ca principal nutrient.

Forma cea mai simplă de interrelație este asociată cu insectele, care, depunînd ouă în țesuturile vegetale (muguri, frunze sau tulpini), determină creșterea anormală a acestora cu formarea de gale (mici tumorete). Este probabil că, în același timp, insecta depune și spori fungici care germinează și cresc parazitar pe țesutul galelor, formînd un strat gros micelial în interiorul acestora.

Spre exemplu, la *Cytisus laburnum (Fabaccae*, leguminoase) cu *Diplodia* sau la *Asteromyia* cu *Sclerotium asteris* (fig. 99).

Relația dintre insecte și fungi este o relație specifică, după cum s-a demonstrat în cele cîteva cazuri studiate.

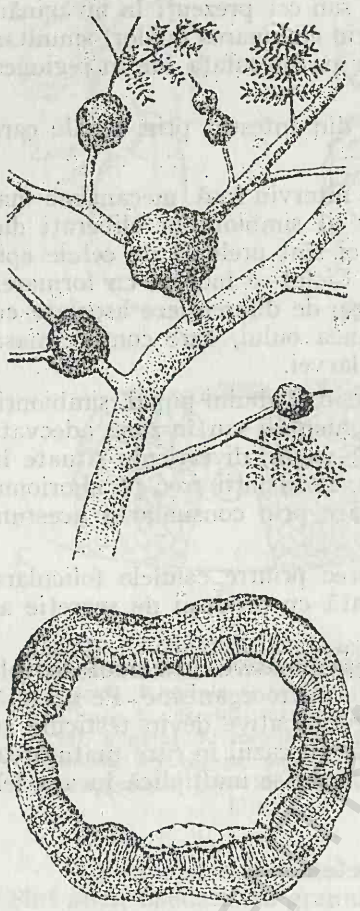


Fig. 99.—Reprezentarea schematică a unor gale care includ larve de *Lasioptera*. Fungii paraziți la plantă acoperă fața internă a galelor (după Batra și Batra, 1967).

Relația simbiotică este relativ simplă: insecta asigură transmiterea fungilor într-un mediu protejat, în care acestea se dezvoltă, degradînd țesutul galei la forme ce pot fi utilizate de insecte. Acestea se hrănesc în plus și cu seva plantelor atacate (Batra și Batra, 1967).

Simbioza dintre insectele din genurile *Sirex, Tremex* și *Urocerus (Hymenoptera)* cu fungii din genurile *Stereum, Daedalea* etc. evoluează într-un mod cu totul particular, descifrat în sistemul *Sirex gigas/Amylostereum* (Batra și Batra, 1967). Femela adultă de *Sirex* inoculează în lemn, cu ajutorul unui ovipozitor lung și fin, un mucus toxic, care face arborele susceptibil la infecția fungică. Ea este inițiată de însămînțarea, pe aceeași cale, a unor spori de rezistență sau a unor micromicelii. Procedeul favorizează infectarea eficientă, pentru că evită străbaterea barierei de protecție reprezentată de țesuturile corticale. Miceliul fungic se dezvoltă în structura lemnului, iar larva ieșită din ou începe să înainteze în urma sa. Fungii digeră parțial lemnul înainte de a fi ingerat de larve.

Transferul fungilor de la o generație la alta este favorizat de prezența unei structuri specializate ca o pungă, situată la ♀ adulte la baza ovipozitorului. În ea sînt depuse micromicelii impregnate cu ceară, care vor genera un miceliu fungic, și, final, spori-oidii, care aderă de suprafața ouălor (Batra și Batra, 1967).

Asociația insecte/fungi are un efect letal pentru arbore, deoarece colonizarea fungilor în structura lor afectează sever capacitatea de apărare prin obturarea canalelor rezinifere și a vaselor conducătoare. Final, uscarea și necroza țesuturilor vegetale favorizează atacul insectelor xilofage.

O relație de mutualism pur caracterizează asocierea dintre insectele *Coccidae* (păduchi țestoși) și fungii din genul *Septobasidium*. După unele date, *Septobasidium* nu se dezvoltă independent în natură, ci numai în asociere cu insectele care se localizează în stratul gros și dens de filamente fungice cu aspect marmorat, asemănător unui lichen. El se dezvoltă strîns aderent pe frunze sau pe ramurile copacilor (Batra și Batra, 1967).

Insectele tinere se deplasează prin miceliu, contaminîndu-se cu spori fungici aderenți, pe care îi vehiculează în structura arborelui sau îi transmit la alte plante sănătoase. Insecta este ancorată în țesuturile vegetale prin intermediul unei trompe, lungi și subțiri, sugînd seva acestora. O parte din insecte sînt penetrate de haustori fungici, care extrag nutrienți din corpul lor.

Relația este bilateral benefică. Fungii conferă insectelor un habitat adecvat, la adăpost de rigorile mediului extern, de paraziți și de prădători. Insectele sug mai multă sevă decît este necesar pentru propria lor dezvoltare, asigurînd nutriția fungilor pe calea haustorilor. Ele acționează, de asemenea, pentru dispersarea fungilor în natură. Insectele atacate prin haustori sînt sacrificate pentru beneficiul coloniei. Ele nu ajung la maturitate și nu se reproduc. Continuitatea coloniei mutualiste în care ambii parteneri beneficiază de arborele-gazdă este asigurată de insectele nepenetrate de haustori, care perpetuează transmiterea infecției.

### Simbioza protozoare — insecte

Termitele și gîndacii xilofagi, incapabili să degradeze celuloza și lignina, conțin în mod obișnuit protozoare flagelate polimastigote și hipermastigote. Acestea sînt grupate într-o masă solidă, localizată într-o dilatație sacciformă a intestinului terminal. Datorită abundenței lor, pot reprezenta peste o treime din greutatea corporală a insectelor. La rîndul lor, protozoarele flagelate poartă endosimbionți bacterieni care le furnizează, probabil, o parte din celulazele necesare pentru degradarea substratului nutritiv.

Termitele transferă flagelatele de la o generație la alta prin infectarea nimfelor ce se hrănesc cu picăturile de materii fecale exsudate de la adulții contaminați cu simbionți. Gîndacii xilofagi se infectează, de regulă, cu materiile fecale uscate care conțin chisti rezistenți la desicație. Aceștia germinează în intestinul nimfelor și restabilesc simbioza.

În această asociație, hormonul ecdisona ($C_{27}H_{44}O_6$), sintetizat de glandele pretoracice și de celulele neurosecretoare din creierul insectei implicat în declanșarea metamorfozei, induce procesul de formare a chiștilor. Fenomenul are o importanță deosebită, deoarece asigură supraviețuirea protozoarelor în materiile fecale uscate și infectarea eficientă a nimfelor. Același hormon controlează, după cum s-a demonstrat la gîndacul xilofag *Cryptocercus punctulatus*, ciclul sexual al protozoarelor: acestea se reproduc asexuat în nimfă și sexuat cînd insecta năpîrlește.

Relația este mutual benefică. Insectele asigură habitatul protozoarelor și protecția de factori externi. De asemenea, asigură controlul ciclului sexual prin intermediul hormonului ecdisona. Capacitatea lor de xilofagie este condiționată de relația ectosimbiotică, respectiv de prezența fungilor celulozolitici și de bacteriile endosimbiotice ale acestora.

### Rolul simbionților în biologia insectelor și a arahnidelor

Modalitatea cea mai sigură de studiu al rolului simbionților este reprezentată de urmărirea efectelor îndepărtării lor prin ablație chirurgicală sau tratament cu antibiotice. Procedeul este relativ dificil, deoarece menținerea coloniilor de organisme aposimbiotice este condiționată de cunoașterea și de satisfacerea exigențelor lor nutritive, care sînt variabile de la o insectă la alta.

**Rolul simbionților în nutriție.** Coincidența dintre prezența simbionților la insectele hematofage și, în general, la cele cu o nutriție incompletă a dus la ideea implicării lor directe în nutriția gazdelor, deși frecvent sînt izolați de funcțiile digestive (fig. 100).

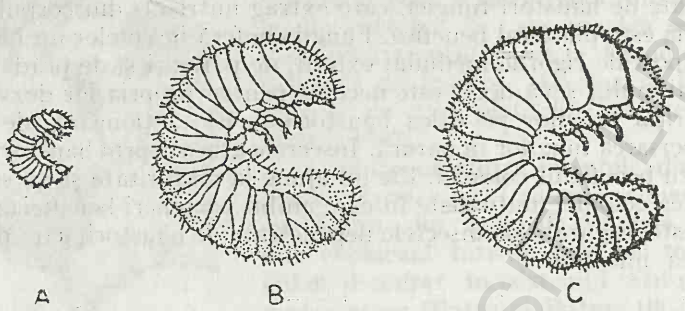



Fig. 100. — Efectul levurilor simbionte asupra dezvoltării la *Sitodrepa panicea*. Toate larvele au vîrsta de 10 săptămîni. **A.** Larve lipsite de simbionți, hrănite normal. **B.** Larve fără simbionți, hrănite cu o dietă îmbogățită (25% levuri uscate). **C.** Larve cu simbionți, hrănite normal (după Buchner, 1965).

Studiile efectuate pe *Rhodnius prolixus*, hemipter hematofag pe animale mici, folosit curent ca model experimental pentru *Triatoma infestans* (care vehiculează *Trypanosoma cruzi*, agentul bolii *Chagas*) au confirmat aceste presupuneri. Îndepărtarea simbionților — *Nocardia rhodnii* — are drept rezultat apariția unor insecte aposimbiotice, care cresc lent, au aripi deformate și sfărîmicioase și nu se reproduc. Infectarea cu simbionții proprii, cultivați *in vitro* le readuce la normal.

În mod asemănător, îndepărtarea chirurgicală a micetomului de la unele insecte imature (*Pediculus* sp.) sau distrugerea conexiunilor lui prin centrifugare duc la depunerea unor ouă din care ies nimfe fără simbionți. Acestea se hrănesc și se dezvoltă normal 5—6 zile, după care mor brusc. Deficitul poate fi compensat prin administrarea intraanală de vitamine din grupul B și extract de drojdie. Cu ocazia acestor experiențe s-a demonstrat că dozele mari de vitamine și factori de creștere sînt nocive atît pentru insectele aposimbiotice, cît și pentru cele normale.

Un fenomen similar a fost semnalat la *Triatoma* ai cărei simbionți sintetizează *in vitro* o cantitate de 2 500 ori mai mare de acid folic decît cea necesară pentru propria lor creștere. Cu toate acestea, supradozele de acid folic sînt toxice pentru insecte.

Aceste observații demonstrează că rolul simbionților este mai complex decît simpla suplinire a unor nutrienți deficitari și pledează pentru ideea că insectele aposimbiotice nu au capacitatea de a determina doza necesară de vitamine sau de factori de creștere.

Un fapt încă inexplicabil este prezența constantă a simbionților la *Blattidae*, care sînt omnivore și au prin definiție o nutriție completă. Cu toate acestea, gîndacii aposimbiotici sînt organisme patologice, incapabile să se dezvolte normal. Este probabil că simbionții le furnizează unii aminoacizi ca tirozina, fenilalanina, valina, izoleucina și arginina, care apar în organismul gîndacilor hrăniți cu [$^{14}$C] glucoză și care sînt absenți la organismele aposimbiotice.

În unele cazuri s-a demonstrat că simbionții furnizează gazdei biotină, tiamină, acid pantotenic, mezoinozitol, acid folic, acid nicotinic etc. a căror concentrație este proporțională cu densitatea lor.

În sfîrșit, unii simbionți îmbogățesc echipamentul enzimatic al gazdelor cu enzime ca: amilaze, celulaze, pectinaze, hemicelulaze, lipaze, proteaze etc., care măresc capacitatea acestora de a degrada unele substrate neobișnuite sau altfel inaccesibile, deci posibilitatea de a coloniza noi habitate.

Brock (1966) semnalează importanța ectosimbionților ca agenți activi în procesele de digestie ale gazdei. În cazul digestiei celulozei, termitele xilofage sînt dependente de intervenția protozoarelor flagelate care realizează procese de fermentație al căror produs principal este acidul acetic, utilizat de insecte ca sursă de energie. Desfășurarea acestor procese în condiții de anaerobioză reprezintă un avantaj pentru gazdă, care pierde sub formă de căldură o cantitate considerabil mai mică decît în metabolismul aerob.

**Rolul simbionților în reproducere.** După Brooks (1967), una dintre consecințele majore ale deficitului nutrițional al insectelor aposimbiotice este apariția fenomenelor de reproducere alterată.

Îndepărtarea simbionților pe cale fizică sau chimică duce la întîrzieri sau la opriri în dezvoltare, prezența unor ovare atrofiate, perturbarea ciclului de reproducere sau blocarea formării organelor sexuale femele (la foarte multe insecte, micetocitele sînt dezvoltate numai la ♀, în timp ce la ♂ sînt atrofiate).

Au fost semnalate numeroase cazuri de influență asupra determinismului sexual.

Buchner (1955) a semnalat că la *Strictococcus diversiseta silvestri* dezvoltarea organismelor femele are loc numai din ouă care întîmplător au venit în contact cu simbionți pe care i-a înglobat, în timp ce masculii se dezvoltă numai din ouă neinfectate.

În mod asemănător, la *Drosophila*, după Poulson și Sakaguchi (1961) raportul dintre sexe ar fi reglat de prezența unei spirochete transmise de la organismele ♀, la care ar produce moartea unei anumite proporții de zigoți ♂.

Endosimbionții bacterieni prezenți în oocitele și ouăle insectei xilofage *Xileborus ferugineus* au un rol important în controlul raportului sexelor.

Femelele aposimbiotice nefecundate depun ouă, din care rezultă masculi haploizi. În cazul prezenței endosimbionților bacterieni (coci Gram-pozitivi) în oocite, înmulțirea partenogenetică este împiedicată (Peleg și Norris, 1972)

Simbionții au mai fost implicați în metabolismul excretor al insectelor. Ei degradează sau convertesc produșii toxici de metabolism (ureea, acidul uric, xantina la $NH_3$) în forme netoxice asimilabile sau ușor de eliminat. Această proprietate este esențială la afide care nu au tubuli malpighieni.

## Ectosimbioza fungilor de ambrozie cu insectele

Schmidberger (1836) a descris sub denumirea de „Ambrosia"* învelișul strălucitor al galeriilor săpate în lemn de unele insecte dendrofile, înainte de a se descoperi natura lui fungică. Ulterior s-a demonstrat capacitatea unor insecte care sfredelesc lemnul, dar nu-l pot utiliza, de a „cultiva" anumite categorii de fungi ce le servesc ca principală sursă de nutrienți. Fenomenul a

* *Ambrosia* (gr. „ambrosios" = nemuritor, elixirul vieții), orice lucru cu miros sau gust plăcut (mit. = hrana zeilor).

fost descris ca „insecte care cultivă fungii („Fungus culturing insects") sau de „culturi fungice ale insectelor" („Fungus gardens of insects"), deoarece ele asigură însămînțarea fungilor, favorizează cultivarea lor și controlează dezvoltarea acestora în raport cu necesitățile lor specifice.

Spre deosebire de insectele xilofage, care folosesc microorganismele endosimbionte pentru a degrada și utiliza lemnul ca nutrient, formele ambroziene permit dezvoltarea independentă a fungilor care atacă lemnul, cu producerea unei hrane concentrate pe seama constituenților acestuia. Schedl (1958) a descris acest mod de nutriție ca xilomicetofagie, dar Baker (1963) preferă ca sinonim termenul de „ambrozie" ca mai eufonic.

*Insectele-gazdă* sînt reprezentate de trei grupe majore:

1) Gîndacii de ambrozie: aparțin ord. *Coleoptera* și respectiv familiilor *Scolytidae* și *Platypodidae*.

2) Termitele aparținînd genurilor *Odontotermes*, *Macrotermes*, *Microtermes* etc.

3) Furnicile xilofage din genurile *Cyphomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Atta* ș.a.

*Fungii de ambrozie* aparțin ord. *Ascomycetales* și *Fungi imperfecți*. Au fost identificate numeroase specii aparținînd genurilor: *Ceratocystis*, *Cladosporium*. *Cephalosporium*, *Penicillium*, *Botrydiplodia*, *Endomyces*, *Endomycopsis*, *Leptographium*, *Monilia*, *Candida* și unele genuri mai recent identificate ca *Ambrosiamyces*, *Ambrosiella* etc.

În mod obișnuit, o specie de insecte „cultivă" o singură specie fungică. (fig. 101). Menținerea purității culturii este asigurată pe două căi: 1) prin antagonismul fungilor de ambrozie cu microorganismele „străine" contaminante; 2) prin secrețiile depuse de insecte, care au efect antimicrobian.

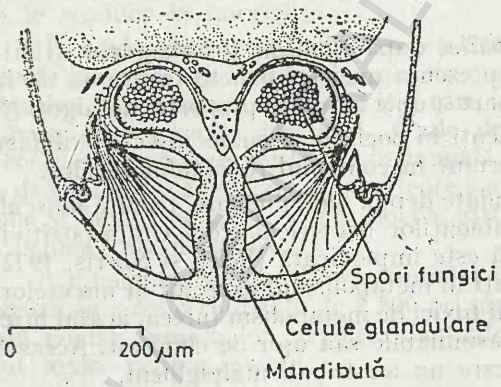



Fig. 101. — Secțiune prin capul gîndacului de ambrozie, *Xyleborus monographus*, evidențiind pungile speciale pentru stocarea sporilor fungici (din Stanier, 1970).

Fungii de ambrozie prezintă dimorfism celular: cultivați *in vitro*, pe medii de cultură artificiale, ei au formă miceliană. Cînd sînt cultivați de insecte, devin levuriformi, cu unele particularități specifice în funcție de natura gazdei:

a) celule asemănătoare levurilor, formînd o structură densă, în cazul asocierii cu gîndacii de ambrozie;

b) sferule albe acoperite de o secreție, în cazul celor asociați cu termitele și

c) sub forma unor hife cu extremități globulare, ca o măciucă, în cazul celor cultivate de furnici (fig. 102).

Mecanismul tranziției de la o formă la alta a fost studiat de Frech și Roeper (1972) în cadrul asocierii dintre *Xyleborus dispar (Coleoptera-Scolytidae)* și fungii imperfecți *Ambrosiella hartigii* Batra. Forma tipică levuri — formă „ambrozială" apare numai în prezența insectelor. Forma miceliană, caracteristică pentru culturi, poate fi convertită experimental la cea levuriformă,

dacă este expusă timp de patru zile contactului *in vitro* cu femele active (care și-au încheiat diapauza). Cu această ocazie, ei au demonstrat că prezența formei „ambroziale" a fungilor este necesară la *X. dispar* pentru asigurarea ovipoziției, a dezvoltării larvelor și pentru împupare.

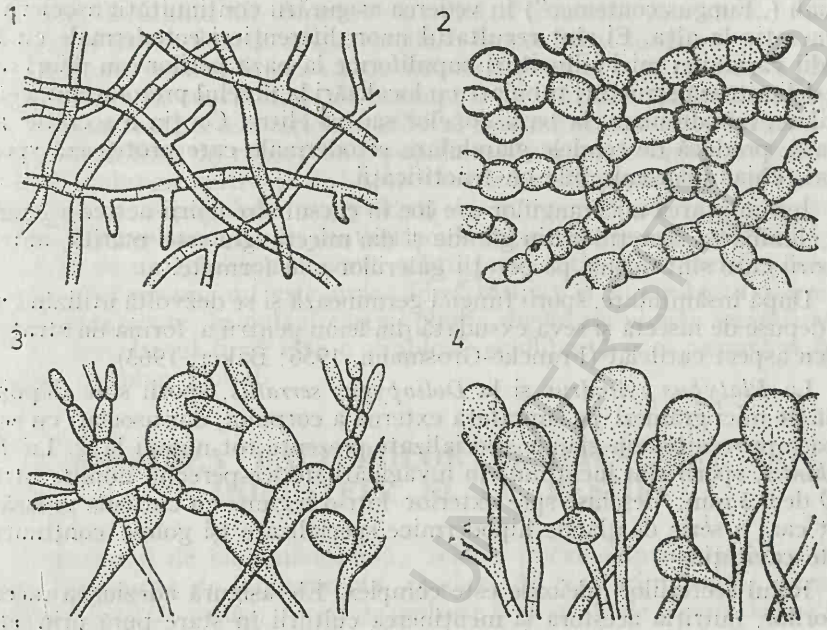



Fig. 102. — Modificările morfologice ale fungilor cultivați de către insecte. **1.** Creștere micelială *in vitro*. **2.** Aspecte levuriforme ale fungilor din galeriile gîndacilor de ambrozie. **3.** Fungi din galeriile termitelor, prezentînd sferule albe. **4.** Fungi asociați cu furnicile, avînd extremități îngroșate ca o măciucă. Stadiul 1 este asemănător în toate cazurile. Stadiile 2, 3 și 4 pot fi realizate și în laborator dacă se realizează condiții similare celor din galeriile insectelor (mediu acid, bogăție în aminoacizi, expunerea la $<0{,}5$ $CO_2$ etc.) (după Batra și Batra, 1967).

## Specificitatea interacțiunii dintre fungi și insecte

Studiul riguros al unor sisteme simbiotice a arătat, cel puțin în unele cazuri, existența unui grad însemnat de specificitate în sensul că anumite specii de insecte intră în relație cu o singură specie fungică sau cel mult cu două specii fungice. Astfel, au fost definite cuplurile de insecte și fungi: *Apterostygma mayri*/*Auricularia* sp.; *Cyphomyrmex rimosus*/*Tyridomyces formicarum*; *Myricocypta bueznlii*/*Lepiota* sp. ; *Acromyrmex disciger*/*Leucocoprinus* sp. sau *Agaricus* sp.

## Modul de transmitere a infecției și de producere a culturilor fungice

Insectele atacă în special lemnul slăbit de boli, secetă sau doborît recent și plin de sevă. Galeriile au o deschidere circulară și se extind adînc în alburn (lemnul periferic, de culoare deschisă, cu rol funcțional), avînd aspectul unor „găuri împușcate" („Shotholes") (Batra și Batra, 1967).

Modul de infecție a fost studiat la unele scolitide și pare să aibă un caracter general. Sporii fungici sînt menținuți în stare levuriformă în toată perioada de hibernare a gîndacilor în organe specializate — denumite micangii sau micetangii — prezenți numai la organisme ♀ în care se acumulează. Micangiile sînt structuri specializate pentru depozitarea și transportul simbionților ambroziali („Fungus conteiner") în vederea asigurării continuității asocierii de la o generație la alta. Ei sînt rezultatul unor diferențieri ectodermale cu formă și sedii variabile: mici adîncituri cupuliforme la baza perilor sau pliuri adînci, care delimitează structuri tubulare cu localizări la nivelul pretoracelui, cefalice, maxilare, mandibulare, la baza coxelor sau pe elitre. Conțin o secreție grasă, ceroasă, produsă de celulele glandulare ectodermale care protejează sporii și, uneori, chiar micromiceliile cu fructificații.

Însămînțarea micetangiilor are loc în cursul sfredelirii active a lemnului, cînd eliminarea secrețiilor din glande și din micetangiu este mărită, antrenînd și sporii care sînt depuși pe pereții galeriilor nou formate.

După însămînțare, sporii fungici germinează și se dezvoltă utilizînd secrețiile depuse de insectă și seva exsudată din lemn pentru a forma un strat micelian cu aspect catifelat (Francke-Grosmann, 1956; Baker, 1963).

La *Platypus cylindrus* și la *Doliopygus serratus*, sporii sînt depuși sub formă de mici grămezi pe suprafața externă a corpului, dar asociați cu secrețiii uleioase provenite din glande specializate prezente tot numai la ♀. La *Platypus hintzi*, sporii sînt menținuți în invaginări sferice-perechi, numite utricule, cu Ø de 0,3 mm, deschise spre exterior într-o regiune cu cuticula groasă și în acest caz, o serie de glande hipodermice specializate își golesc conținutul în aceste cavități.

Rolul secrețiilor uleioase este complex. Ele asigură adeziunea mecanică a sporilor, nutriția acestora și menținerea culturii în stare pură prin efectul lor antimicrobian. Insectele, atrase de mirosul metaboliților fungici, se hrănesc cu miceliul, care concentrează în celulele sale nutrienți extrași din lemn. În intestinul adulților și al larvelor din fazele tardive au fost evidențiate fragmente de lemn, dar nu se știe dacă acesta poate fi utilizat ca un supliment de nutrienți. De menționat, totuși, că la unele insecte *(Platypus cylindrus)* au fost evidențiate prezența unor hemicelulaze, iar la altele *(Phloeosinus bicolor)* chiar capacitatea de a degrada lemnul și hemicelulozele.

**Semnificația simbiozei.** Asocierea fungilor de ambrozie cu insectele este o formă de ectosimbioză cu caracter de mutualism.

Insectele oferă habitate fungilor în mediul umed al galeriilor, pregătind „patul" pentru cultivare, fertilizîndu-l cu ajutorul diferitelor secrețiii și cu dejecții. Ele asigură transferul fungilor de la un arbore la altul, însămînțarea sporilor, stimulînd germinarea și colonizarea galeriilor. Secrețiile lor, în special cele ceroase, în afară de rolul de nutrient, influențează dezvoltarea fungilor și tranziția de la o formă micelială la cea levuriformă „ambrozială". De asemenea, ele împiedică, prin acțiunea lor antimicrobiană, suprainfecția galeriilor cu fungi străini. Aceștia apar numai după ce insectele au părăsit anumite galerii. În sfîrșit, insectele mențin condițiile de temperatură și de umiditate necesare pentru dezvoltarea fungilor, închizînd sau deschizînd galeriile în funcție de condițiile externe.

Fungii de ambrozie convertesc lemnul, inaccesibil insectelor, în biomasă bogată în proteine, care reprezintă sursa majoră de hrană și factori de creștere

pentru insecte. Larvele și, probabil, și cele mai multe insecte adulte sînt integral dependente de biomasa fungică.

Ei produc o serie de steroli esențiali pentru împupare, sintetizează și secretă sau excretă o serie de substanțe antibiotice.

În același timp, dezvoltarea fungilor de ambrozie produce mari pagube economice, decurgînd din deprecierea calității lemnului, făcîndu-l de calitate inferioară și prin culoarea neagră produsă de creșterea fungilor.

La prima vedere, faptul că un simbiont (insecta) își devorează partenerul fungic este în contradicție cu conceptul de simbioză mutualistă, care implică o coexistență a asociației. Conflictul este numai aparent, deoarece fenomenul se manifestă în raport cu o populație și nu cu un organism individual. Fungii de ambrozie cultivați de insecte beneficiază ca populație, deși o anumită parte din această populație este prădată la un moment dat, fără a afecta persistența și dezvoltarea lor în continuare. Relația este de exploatare reciprocă, controlată de un echilibru dinamic subtil între activitățile beneficiale și cele negative. Fenomenul nu este unic, fiind întîlnit și în simbioza *Rhizobium*/plante leguminoase, în cursul căreia planta digeră un număr semnificativ de bacterii. Rezultatul final este o simbioză echilibrată care asigură o funcție esențială pe plan global.

## SIMBIOZA BACTERIILOR LUMINESCENTE CU MOLUȘTELE ȘI CU PEȘTII

Fenomenul de bioluminescență, relativ frecvent în regnul animal, este adesea determinat de luminescența produsă de țesuturile proprii animalelor respective. Există, totuși, o serie de moluște și peste 30 de genuri de pești teleosteeni (aparținînd la 11 familii), care au organe specializate, intens vascularizate, pentru a asigura aportul de $O_2$ și nutrienți, care conțin fotobacterii specifice*[1].

*Bacteriile luminescente sînt prezente la moluște* din clasa *Cephalopoda*, fiind studiate, în special, la *Euprymna morsei*, din subordinul *Myopsida*. Aceste bacterii nu au fost cultivate și în consecință nici identificate.

„Organele" luminoase cu organizare complexă sînt inclavate în sacul cu cerneală și parțial acoperite de un țesut reflectorizant și apoi de o „lentilă" compusă din celule hialine care transmit lumina (fig. 103).

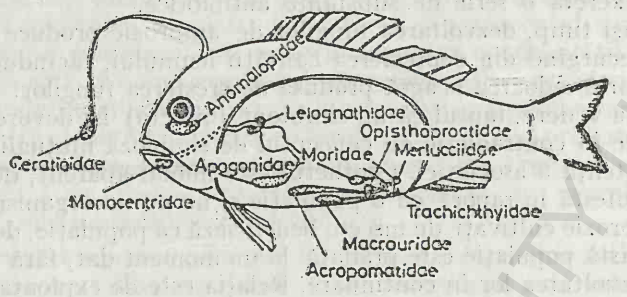
Ele reprezintă un mecanism specializat de control al emisiei de lumină: contracția musculară apasă pe sacul cu cerneală, împingîndu-l între sursa de lumină și lentilă. Marea complexitate anatomică a organelor luminoase sugerează că ele au evoluat paralel cu emisia de lumină și că au o mare valoare pentru gazdă (Stanier și colab., 1976).

*Bacteriile luminescente ectosimbiotice la pești.* Ele aparțin genului *Photobacterium*, cu speciile *P. phosphorum*, *P. fischeri*, *P. leiognathi* asociate specific cu anumite localizări la diferite grupuri sistematice de pești (fig. 103). Hastings și Nealson (1979) le consideră ca endosimbionte.

Ele sînt localizate în organe specializate, adevărate camere de cultură, pline cu bacterii, deschise spre exterior, ceea ce favorizează infecția din mediu. La *Photoblepharon* („Flaslight fish"), ele au structura unor „pungi" speciale

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 193.

situate sub ochi, avînd capacitatea de reglare a emisiei de lumină printr-o structură asemănătoare unor pleoape (fig. 104). La *Anomalops* sp. „organul" luminos însuși poate fi rotit în jos.




| P. phosphoreum | P. fischeri | P. leiognathi | Necultivabile | Neidentificate |
|---|---|---|---|---|
| Macrouridae | Monocentridae | Leiognathidae | Ceratioidae | Acropomatidae |
| Melucciidae | | Apogonidae | Anomalopidae | |
| Moridae | | | | |
| Opisthoproctidae | | | | |
| Trachichthyidae | | | | |

Fig. 103. — Reprezentarea schematică a localizărilor, mărimii și deschiderii spre exterior ale organelor luminoase la mai multe familii de pești luminoși („Ichtylicht"), care poartă bacterii luminescente simbiotice, ca sursă de lumină. În figură sînt înscriși taxonii bacterieni cunoscuți ca fiind asociați specific cu fiecare grup de pești (după Hastings și Nealson, 1979).

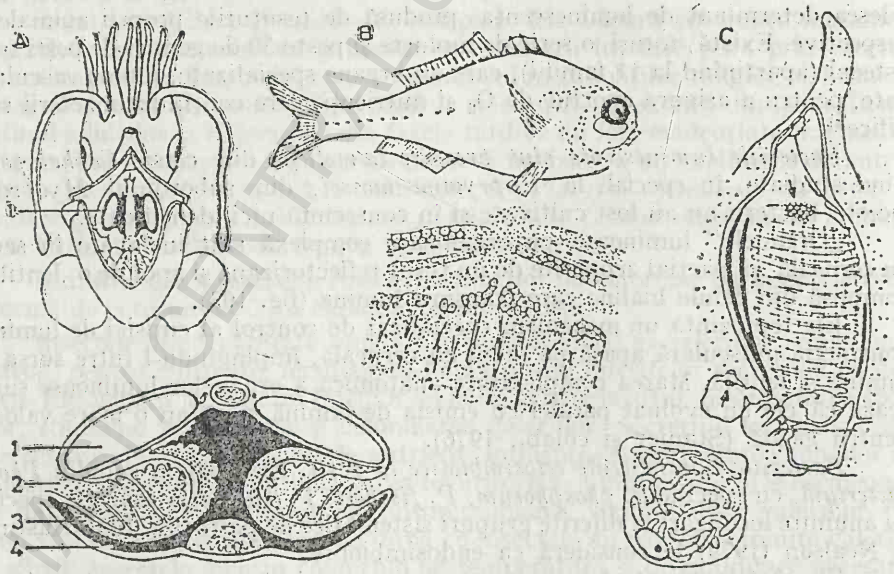



Fig. 104. — Relațiile bacteriilor simbiotice luminescente cu organismele animale. **A.** Cefalopodul *Euprymna morsei*, cu mantaua deschisă, în secțiune transversală prin organul luminos, evidențiind: *1*, lentila; *2*, sediul bacteriilor luminescente; *3*, reflectorul; *4*, sacul cu cerneală. **B.** Peștele *Anomalops* cu organul luminos situat sub ochi; jos — secțiunea prin organul luminos, evidențiind bacteriile în pliurile sale. **C.** Tunicierul *Pyrosoma* cu organele luminoase evidențiate printr-o săgeată; jos — un micetocit (după Kishitani, 1932 și Buchner, 1960).

După Dyer (1989), bacteriile sînt atît de integrate ca entități funcționale definite la *Photoblepharon*, încît fără ele definiția acestora ar fi incompletă sau inadecvată.

**Semnificația ecologică.** Habitatul simbiotic implică, pentru bacterii un avantaj real, deoarece găsesc în organismul gazdei hrană și adăpost față de competitorii lor. Organismele marine beneficiază de emisia de lumină pe trei căi diferite: a) în favorizarea atacului asupra pradei (detectare ,atracție și captură); b) în reacțiile de apărare ,(evitarea prădătorilor) și 3) în comunicarea intraspecifică prin iluminarea mediului înconjurător (Morin și colab., 1975).

În organele luminoase, ca și în culturi, fotobacteriile emit lumină în mod continuu, dar controlul emisiei la exterior este asigurat de organismul-gazdă, prin unele mecanisme specifice ale acestuia (prezența unui sistem obturator, rotația organului luminos etc.). Peștii ceratoizi *(Ceraticida)* au o structură luminoasă „de momeală", care atrage alte organisme ce devin pradă.

În plus ,proiectarea luminii preponderent ventrală a celor mai mulți pești pledează pentru utilizarea luminii în scopul evitării prădării pe diferite căi: sperierea și abaterea prădătorilor, mascarea siluetei peștelui prin contrailuminare (intensitatea și culoarea luminii emise ventral în cursul zilei se combină cu lumina care coboară de la suprafața apei).

Bacteriile luminescente se dezvoltă intens și emit lumină și în numeroase alte nișe ecologice, în afara organelor luminoase specifice. Ele ar putea fi rezultatul unor „eliminări oportuniste" sau prin „prea plin" din organele luminoase și, ca urmare, emiterea de lumină nu ar reprezenta un avantaj puternic pentru selecție.

Hastings și Nealson (1979) consideră că întrucît fotobacteriile sînt enterobacterii marine adevărate, luminescența oferă un avantaj în selecție, corelat cu dispersia și propagarea lor.

Dezvoltarea lor pe diferite substraturi ca parazite (pe crustacee) sau saprofite (pe suprafața peștilor morți sau în resturile fecale luminescente) determină producerea de suficientă lumină pentru a atrage diferite organisme care le ingeră, asigurînd multiplicarea și răspîndirea lor în mediul natural respectiv (Robinson și Morin, 1977).

### Simbiozele complexe

Protistele trichomonade aparținînd speciei *Myxotricha paradoxa*, simbionte în intestinul terminal al unor termite australiene, poartă, la rîndul lor, trei simbionți și anume: doi ectosimbionți și un endosimbiont. Ele au fost descrise inițial ca avînd suprafața acoperită integral de flageli cu diferite dimensiuni. În realitate, protozoarul are patru flageli anteriori, în timp ce restul celulei este acoperit de spirochete animate de mișcări ondulatorii sincrone, foarte puternice (simbionți de motilitate), care asigură deplasarea neîntreruptă a gazdei în intestinul termitelor. În plus, fiecare spirochetă simbiotică este asociată cu o altă bacterie situată pe suprafața externă a gazdei și un al treilea tip de bacterii (endosimbiotice), care trăiesc în interiorul protozoarului. Stratul bacteriilor de la suprafață este atît de dens încît împiedică orice alt contact al suprafeței protistelor cu mediul. Microscopia electronică a demonstrat că unele spirochete sînt legate de gazdă printr-un dispozitiv tip „mufă". Dyer (1989) consideră că rolul lor major ar fi de senzori de suprafață (fig. 105).

Sieburth (1975), studiind prin microscopie electronică cu scanning suprafața mai multor organisme marine, a observat colonizarea acesteia cu bacterii, fungi și protozoare. Diversitatea comunităților ectosimbiotice pare să fie specifică de gazdă. El consideră că funcția lor principală ar fi aceea de simbionți cu rol senzorial, intermediari între gazdă și mediu. Ei pot transmite chiar informație specifică la neuroni sau la sistemul senzorial al gazdei.

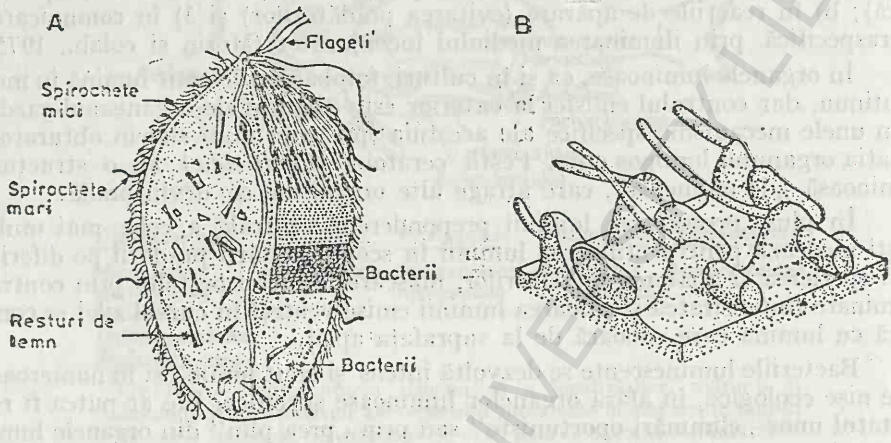



Fig. 105. — Simbioza complexă la protozoarul *Mixotricha paradoxa* din intestinul termitelor australiene (A) cu evidențierea inserției spirochetelor. Sînt reprezentate și două bacterii cilindrice (una secționată) (după Cleveland și Grimstone, 1964).

## SIMBIOZELE FIXATOARE DE AZOT MOLECULAR

### SIMBIOZA *RHIZOBIUM* — PLANTE LEGUMINOASE

**„Un factor major al succesului ecologic al membrilor familiilor de plante leguminoase este capacitatea lor de a intra într-o relație benefică cu bacteriile din sol, din genul Rhizobium, Bradyrhizobium și Azorhizobium. În această asociere, bacteriile induc plantele să dezvolte un nou organ vegetal — nodulul radicular — creînd nișa ecologică necesară pentru fixarea azotului de către bacterii și făcînd astfel planta independentă de azotul din sol".**

T. Bisseling

Aproximativ 1200 specii de plante leguminoase, din cele 12—14 000 existente, sînt capabile să stabilească simbioze cu bacteriile fixatoare de azot Ele includ o parte din membrii familiilor *Mimosaceae* și *Papilionaceae (Fabaceae)* și 30% dintre *Caesalpiniaceae* (Beringer și colab., 1987). Trinick și Gal-

braith (1976) au descris o singură excepție de la această regulă reprezentată de planta *Trema cannabina (Ulmaceae)*. Probabil că simbioza diazotrofă a fost o proprietate generală a leguminoaselor, pierdută de unele genuri și specii după divergența celor trei familii citate.

Leguminoasele au semințe bogate în proteine (aproximativ 25%) comparativ, spre exemplu, cu grîul (aproximativ 10%) și această nevoie suplimentară de N a fost, în cursul evoluției, unul din factorii care au stimulat asocierea fixatorilor de $N_2$ cu aceste plante. Deși nu este esențială, ea oferă o serie de avantaje deosebite.

Incapacitatea unei specii de leguminoase de a nodula poate fi determinată și de absența bacteriilor corespunzătoare în vecinătatea plantei-gazdă.

## Simbiontul bacterian

Bacteriile din genul *Rhizobium* sînt prezente în sol într-un număr variabil, în funcție de condițiile locale. Astfel, în cazul *R. trifolii*, numărul bacteriilor variază între $<1—10^2—10^5$/g în solul recent cultivat lipsit de plante, $10^5—10^8$ g/sol în prezența plantelor și $10^6—10^{11}$ în rizosferă la trifoi. În noduli pot exista aproximativ $10^6$ bacterii viabile.

Răspîndirea eficientă în sol este favorizată de mobilitate și chemotaxie, și depinde de cantitatea de apă prezentă în mediu. În studiile experimentale de competiție s-a demonstrat că tulpinile imobile produc mai puțini noduli decît cele mobile deși mobilitatea nu este necesară pentru nodulare. Rolul de atractant este reprezentat de aminoacizi și glucide (D-glucoză, celobioză, manitol etc.).

Datorită capacității de a infecta alternativ plantele leguminoase, bacteriile din genul *Rhizobium* prezintă un adevărat ciclu de viață în sol (fig. 106).

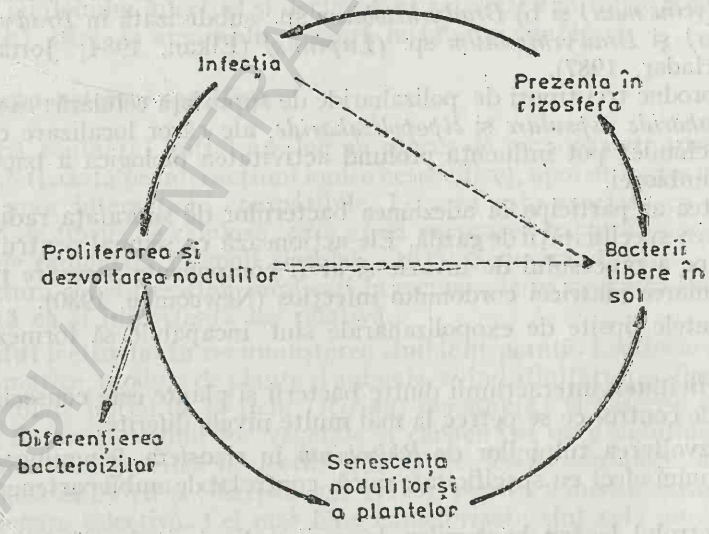



Fig. 106. — Ciclul de viață al bacteriilor din genul *Rhizobium* în sol, evidențiind alternanța dintre stadiul de bacterii libere și simbioză. Graficul prezintă căile principale (———) și pe cele secundare (— — —) (modificat după Beringer și colab., 1979).

În funcție de viteza cu care cresc în culturi axenice au fost descrise două categorii de bacterii simbiotice:

I. Prima cuprinde bacteriile care se multiplică rapid (durata unei generații de ~ 6 ore):

1) *R. leguminosarum* (infectează mazărea *(Pisum sativum)*, bobul *(Vicia faba*, engl. „Horse bean"), lintea *(Lens culinaris)*, *Lathyrus;*

2) *R. trifolii* la *Trifolium pratense;*

3) *R. phaseoli* la fasole *(Phaseolus vulgaris;* engl. „French bean"); *R. meliloti* infectează plantele de *Melilotus* și *Trigonella.*

II. A doua categorie cuprinde bacteriile cu ritm lent de multiplicare din genul *Bradyrhizobium*, cu speciile *B. japonicum* pentru soia *(Glycine max)* și *Vigna sinensis* (engl. „cowpea").

Bacteriile din genul *Rhizobium* au, în general, un spectru de gazde bine definit, implicînd în mod obișnuit specii dintr-un anumit gen sau din genuri de plante înrudite (corespunzînd grupelor de inoculare „încrucișată").

Există însă și exemple de nodulare „incorectă" ca și de nodulare a unor plante neleguminoase (Hepper, 1978). Clasificarea grupului *Rhizobium* în raport cu „grupele de inoculare", respectiv cu sensibilitatea diferitelor specii de leguminoase la infecția și nodularea de către o anumită specie de *Rhizobium* are o serie de avantaje atît pentru cercetare, cît și pentru practică.

Noua clasificare bazată pe hibridarea ADN și pe studiile de taxonomie numerică împarte grupul *Rhizobium* în două genuri:

1) Genul *Rhizobium* include speciile care cresc rapid și este reprezentat de: a) *Rhizobium meliloti (Medicago)*, b) *R. loti (Lupinus, Lotus)* și c) *R. leguminosarum*, care este subdivizat în biovar *trifolii (Trifolium* sp.), biovar *phaseoli (Phaseolus vulgari)* și biovar *viceae (Pisum, Lens)*.

2) Grupul *Bradyrhizobium* conține două specii: a)*Bradyrhizobium japonicum (Glycine max)* și b) *Bradyrhizobium* sp. subdivizată în *Bradyrhizobium* sp. *(Vigna)* și *Bradyrhizobium* sp. *(Lupinus)* (Elkan, 1984; Jordan, 1984; Okon și Hadar, 1987).

Ele produc trei tipuri de polizaharide de suprafață celulară: *exopolizaharide, polizaharide capsulare* și *lipopolizaharide*, ale căror localizare celulară și structură chimică pot influența profund activitatea biologică a bacteriilor și evoluția simbiozei.

Acestea ar participa la adeziunea bacteriilor de suprafața radiculară și la asigurarea specificității de gazdă. Ele acționează ca semnal pentru inducția primei etape a procesului de invazie și ar fi componente necesare nodulului pentru formarea matricei cordonului infecțios (Newcombe, 1980).

Mutantele lipsite de exopolizaharide sînt incapabile să formeze noduli eficienți.

**Specificitatea** interacțiunii dintre bacterii și plante este consecința unor fenomene de control ce se petrec la mai multe nivele diferite:

1) dezvoltarea tulpinilor de *Rhizobium* în rizosfera leguminoaselor, ca rezultat al unui efect cu specificitate mică, controlat de ambii parteneri ai simbiozei;

2) controlul legării bacteriilor de perii radiculari. Specificitatea poate varia în funcție de natura substanțelor care mediază legarea;

3) deformarea perilor radiculari, efect foarte specific controlat de ambii parteneri;

4) infectarea perilor radiculari și formarea cordonului de infecție, de asemenea, proces foarte selectiv;

5) evoluția abortivă a infecțiilor neadecvate.

Multiplicitatea acestor mecanisme care acționează sinergic face posibil ca nici unul dintre ele să nu aibă caracter de specificitate absolută.

Specificitatea relativă a interacțiunii dintre bacterii și plante stă la baza celor șase grupuri de inoculare încrucișată:

1) grupul *Pisum*, infectat de *R. leguminosarum*, include specii de *Vicia*, *Lathyrus*, *Lens*;

2) grupul *Trifolium* include speciile de trifoi infectate de *R. trifolii*;

3) grupul *Glycine* infectat numai de *Bradyrhizobium japonicum*;

4) grupul *Medicago* care cuprinde specii de *Melilotus*, *Trigonella* infectate de *R.meliloti*;

5) grupul *Phaseolus* include specii de fasole infectată de *R. phaseoli*;

6) grupul *Lupinus — Vigna — Lotus* infectat de *R. lupini*.

## INFECTAREA PLANTELOR-GAZDĂ

Deși *Rhizobium* interacționează aproape cu toți perii radiculari prezenți, sînt infectați, efectiv, numai aproximativ 25%. Experimental, s-a demonstrat că din 5—20 de bacterii, numai una este infecțioasă și că nodularea necesită intervenția a minimum 10 celule infectante. Mobilitatea nu este esențială, dar conferă o serie de avantaje.

Legarea bacteriilor de peretele perilor radiculari implică un contact strîns obligatoriu, necesar pentru inducția răspunsului morfologic (involuția peretelui celulei vegetale, deformarea părului radicular, invaginarea plasmalemei, formarea cordonului infecțios și declanșarea activității mitotice a celulelor din cortex etc.), care, în ansamblu, asigură instalarea simbiozei.

### Recunoașterea specifică

După contactul inițial are loc un proces de recunoaștere specifică și de legare laxă (bazată pe interacțiuni ionice nespecifice), apoi de legare ireversibilă, în urma unor interacțiuni compatibile. Legarea este asociată cu producerea localizată de fibrile de celuloză, care ajută ancorarea bacteriilor perpendicular pe celulele radiculare (Napoli și colab., 1975; Sequeira, 1984).

Natura constituenților implicați în recunoașterea specifică este încă controversată ca și importanța lor relativă.

**Rolul lectinelor în recunoașterea simbiont/plantă.** Lectinele sînt proteine neenzimatice, produse de plante și animale, avînd afinități specifice de legare. Au fost izolate inițial de la ricin *(Ricinus communis)* și descrise ca *fitohemaglutinine* datorită originii lor vegetale și capacității de a aglutina hematiile.

Denumirea generică de lectine (de la lat. *legere* = a alege, a selecta) a fost propusă de Boyd și Sharp-Leigh (1959), pentru a ilustra această proprietate de legare selectivă. Cel mai bine caracterizate sînt cele provenite de la plante.

După Liener (1976), prezența lor în cantitate mare (1—10% din greutatea totală a semințelor unor leguminoase) sugerează posibilitatea unui rol fiziologic important în viața acestora.

Broughton (1978) citează următoarele funcții posibile:

1) funcția de anticorpi ai plantelor, cu rolul de a neutraliza microorganismele potențial patogene din sol;

2) inhibarea activității enzimelor fungice și protejarea plantelor de atacul acestora;

3) rol în transportul și/sau stocarea glucidelor în plante;

4) rol în organizarea glicopeptidelor cu activitate enzimatică în sisteme multienzimatice;

5) rol-cheie în diferențierea și dezvoltarea celulelor, în special, în recunoașterea intercelulară;

6) asigurarea specificității de legare *Rhizobium*/leguminoase.

Ideea interacțiunii dintre lectine și polizaharide de pe suprafața celulelor de *Rhizobium* compatibile a fost emisă de Albersheim și Anderson-Prouty (1975) și confirmată de Dazzo și Hubbell (1976) pe baza corelației strînse dintre capacitatea de legare a lectinelor și infecțiozitatea la trifoi. Din aproximativ 1000 de lectine studiate, 13% sînt fitohemaglutinine.

**Structura lectinelor.** Sînt glicoproteine (porțiunea glucidică reprezentînd 1—20%), cu g.m. 60—140 kdal, aproape invariabil tetramere alcătuite din protomere identice dispuse în perechi sau aranjate în diferite combinații de două protomere. Există și abateri de la această schemă.

Broughton (1978) descrie trei tipuri structurale de lectine în funcție de natura protomerelor și de mecanismele corespunzătoare de legare a bacteriilor (fig. 107):

Tipul I, în care toate subunitățile de structură sînt identice, este exemplificat de fitohemaglutinina de la *Canavalia ensiformis (concanavalina A)*.

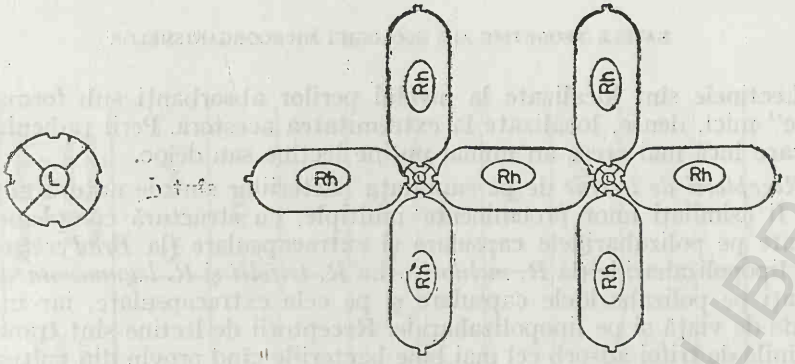
Tipul II, cu protomeri identici perechi, este întîlnit în semințele de *Dolichos biflorus, Lens culinaris, Pisum sativum* și *Vicia sativa*.

Tipul III corespunde lectinelor în care toate cele patru subunități sînt diferite. El este întîlnit la *Phaseolus vulgaris*.

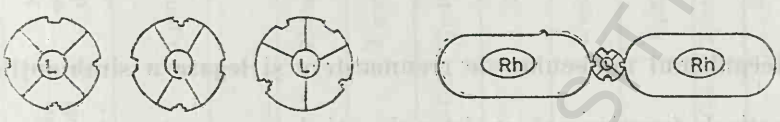
Rezultă, deci, că lectinele tetramere pot fi constituite din subunități perechi sau complet diferite. Lectinele de tipurile II și III, care nu sînt hemaglutinante, sînt numite și incomplete, univalente sau aglutinine indirecte.

**Situsul de legare al lectinelor.** Capacitatea de legare specifică a lectinelor este determinată de prezența pe suprafața lor a unor situsuri de legare sub forma unor adînciturі (engl. „Clefts" sau „Grooves"), concave, pentru a expune o cît mai mare suprafață de legare. Aminoacizii care înconjură cavitatea situsului sînt dispuși în poziții specifice, pentru a obține avantaje majore din interacțiunile electrostatice, legăturile de H sau van der Waals, dintre lectine și bacterii (fig. 108).

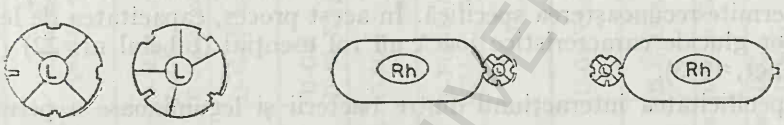
În ansamblu, forma situsului de legare al lectinei este complementară grupărilor oligoglucidice de pe suprafața celulelor de *Rhizobium*. În forma sa cea mai simplă, legarea lectinelor de grupările glucidice (receptorii) bacterieni ar putea fi asemănată cu legarea antigen/anticorp.



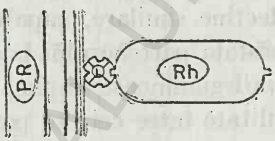

A. Lectinele de tip I și legarea lor de Rhizobium




B. Lectinele de tip II și legarea lor de Rhizobium




C. Lectinele de tip III și legarea lor de Rhizobium




D. Legarea complexului lectină -Rhizobium de perii radiculari

Fig. 107. — Reprezentarea schematică a principalelor particularități structurale ale lectinelor și a modului în care leagă bacteriile din genul *Rhizobium* de perii radiculari : PR — păr radicular (după Broughton, 1978).

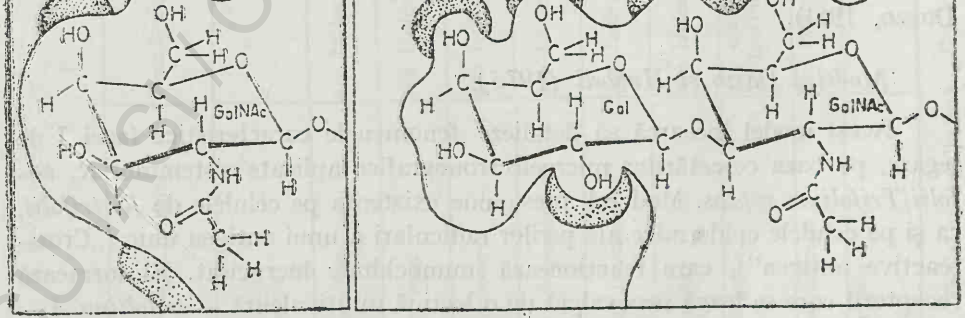



Fig. 108. — Reprezentarea schematică a interacțiunii dintre situsul de legare a lectinelor cu grupările laterale ale anumitor glucide. Aglutinina din soia leagă acetilglucozamina sau glucoza, cea din arahide leagă ferm o combinație de galactoză și acetilglucozamină, sugerînd existența unor situsuri de legare adiționale (punctat, dreapta sus) (după Raff, 1976).

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Lectinele sînt localizate la nivelul perilor absorbanți sub forma unor „petice" mici, dense, localizate la extremitatea acestora. Perii radiculari bătrîni care încă mai cresc au numai puține lectine sau deloc.

*Receptorii de lectine* de pe suprafața bacteriilor sînt de natură glucidică și pot fi asimilați unor proeminențe multiple, cu structură complementară, localizate pe polizaharidele capsulare și extracapsulare (la *Bradyrhizobium)* sau pe lipopolizaharide (la *R. meliloti)*. La *R. trifolii* și *R. leguminosarum* sînt localizați pe polizaharidele capsulare și pe cele extracapsulare, iar în unele perioade de viață și pe lipopolizaharide. Receptorii de lectine sînt tranzitorii. Rădăcinile de trifoi adsorb cel mai bine bacteriile cînd provin din culturi de 5 zile pe medii solide sau din faza staționară timpurie în cazul culturilor în bulion.

## Mecanismul molecular de recunoaștere și legare a simbionților

Lectinele funcționează ca determinanți de recunoaștere deoarece determină natura celulelor cu care se pot asocia plantele suficient de apropiat pentru a permite recunoașterea specifică. În acest proces, capacitatea de legare a anumitor glucide caracteristice joacă un rol esențial (tabelul nr. 22) (Dazzo și Truchet, 1983).

Specificitatea interacțiunii dintre bacterii și leguminoase a permis, pe de o parte, definirea taxonomiei genului *Rhizobium*, iar, pe de alta, pe cea a grupelor de inoculare încrucișată. Existența acestor grupe implică ideea că plantele respective produc lectine similare, capabile să se lege de secvențe glucidice specifice de pe suprafața partenerului bacterian.

Interacțiunea *Rhizobium*/leguminoase implică, în primul rînd, existența unor fenomene de compatibilitate între cei doi parteneri. Incompatibilitatea are drept consecință declanșarea de structuri, care limitează infecția gazdei, acumularea de substanțe inhibitoare sau chiar fenomene de hipersensibilitate ce împiedică eficient răspîndirea infecției.

Figura 109 prezintă sintetic fazele succesive ale infecției perilor radiculari, de care celulele de *Rhizobium* se leagă frecvent (dar nu obligatoriu), cu axul lung perpendicular pe rizoplan. Mecanismele specifice asigură legarea a 22—27 de bacterii pe o lungime de ~200 μm păr radicular (Broughton, 1978; Dazzo, 1981).

### *Modelul Dazzo și Hubbell (1975)*

Acest model încearcă să detalieze fenomenele caracteristice fazei I de legare, pe baza cercetărilor microelectronografice aplicate sistemului *R. trifolii*/*Trifolium repens*. Modelul presupune existența pe celulele de *R. trifolii*, ca și pe celulele epidermice ale perilor radiculari a unui antigen unic („Cross-reactive antigen"), care reacționează imunochimic încrucișat. El formează receptorii care se leagă necovalent de o lectină multivalentă — *trifoliina A*— care, recunoscînd grupările glucidice similare de pe bacterii și plantă, le inter-

*Tabelul nr. 22*

**Principalele proprietăți ale unor lectine de la leguminoase**
(după Broughton, 1978)

| Sursa lectinei | Numărul lectinelor | Protomeri | Greutatea moleculară $\times 10^3$ dal | Specificitatea pentru glucide | Numărul situsurilor de legare | Ionii necesari pentru activitatea aglutinantă |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Canavalia ensiformis* | ? | 4 (identici) | 4 × 26 | D-Man<br>D-Glc<br>D-GalNAc | 1/protomer | $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$ |
| *Dolichos biflorus* | are Izolectine | 4 (două perechi) | 4 × 27 | D-GalNAc | ND | ND |
| *Glicine max* | are Izolectine | 4 (identici) | 4 × 30 | D-Gal<br>D-GlcNAc | 2/tetramer | + |
| *Lens culinaris* | are Izolectine | 4 (două perechi) | 2 × 18 plus 2 × 8 | D-Man | 2/tetramer | $Ca^{2+}$ |
| *Lotus tetragonolubus* | are Izolectine | 4 (ND) | 4 × 27 | L-Fuc-D-Gal-D-Gal-NAc | 1/tetramer | ND |
| *Phaseolus coccineus* | are Izolectine | 4 (identici) | 4 × 34 | ND | ND | ND |
| *P. lunatus* | are Izolectine | 4 (identici) | 4 × 31 | D-GalNAc | 2/tetramer | $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$ |
| *P. vulgaris* | are multe Izolectine | 4 (două tipuri în proporții diferite) | 4 × 43 | D-GalNAc | 1/protomer | + |
| *Pisum sativum* | are Izolectine | 4 (două perechi) | 2 × 18 plus 2 × 10 | D-Man-Met-D-Glc | 2/tetramer | + |
| *Vicia faba* | | 4 (două tipuri) | 2 × 18 plus 2 × 9 | D-Glc<br>D-Man | ND | + |

D-Gal = D-galactoză; D-Glc = D-glucoză; D-Man = D-manoză; D-GalNAc= N-acetil-D-galactozamină; D-GlNAc = N-acetil-D-glucozamină; L-Fuc = L-fucoză; L-Fuc-D-Gal.D-D-Gal-NAc = L-fucoză-2-B-D-galactoză (1—4)-D-N-acetilgalactozamină; Met-D-Glc = = metil-D-glucozid; ND = nedeterminat; + = nevoia de ioni metalici pentru activitate



BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

conectează printr-o *punte moleculară* (fig. 110), favorizînd adsorbția specifică, preferențială, a bacteriilor pe rădăcini. Marcarea fluorescentă a trifoliinei A a demonstrat că legarea este mai frecventă pe celulele diferențiate situate distal de rădăcină. Celulele nediferențiate nu leagă polizaharidele bacteriene.

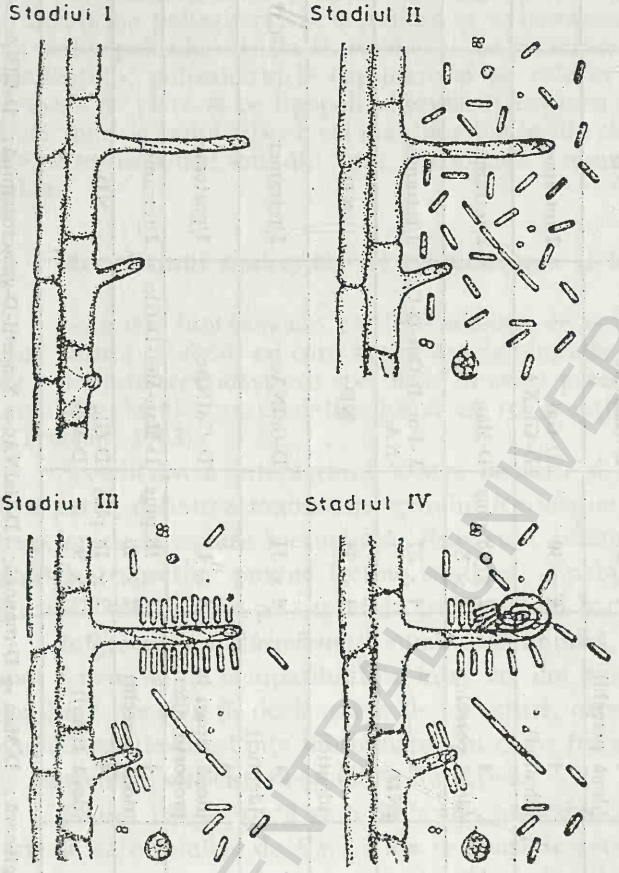



Fig. 109. — Stadiile de dezvoltare ale cordoanelor infecțioase de *Rhizobium* în perii radiculari ai plantelor leguminoase. **I.** Dezvoltarea părului radicular. **II.** Colonizarea rizosferei de diferite microorganisme. **III.** Legarea bacteriilor specifice din genul *Rhizobium* de perii radiculari. **IV.** Inducția deformării părului radicular este urmată de pătrunderea bacteriilor și formarea filamentului infecțios (după Broughton, 1978).

Faza următoare de ancorare fermă a bacteriilor este asociată cu producerea de către bacterii a unui material microfibrilar extracelular (probabil celulozic), care menține contactul dintre simbionți, necesar pentru producerea deformării părului absorbant și pentru infecție. Vester și Bauer (1988) au confirmat sinteza de către *Rhizobium* a unor adezine extracelulare, care ar putea fi fimbrii sau microfibrile de celuloză.

*Modelul alternativ de legare*

Bauer (1981) a observat experimental faptul că interacțiunile *Rhizobium*/leguminoase nu urmează riguros modelul tradițional (fig. 111 A) și că există abateri de la regulile de specificitate. Astfel, celulele de *R. meliloti* sînt adsorbite în număr mare pe celule de trifoi alb, iar *R. trifolii* se leagă de

perii radiculari de mazăre. Modelul propus (fig. 111 B) consideră legarea ca fază ultimă a unei serii de evenimente multiple, reprezentate de interacțiuni de tip semnal/răspuns.

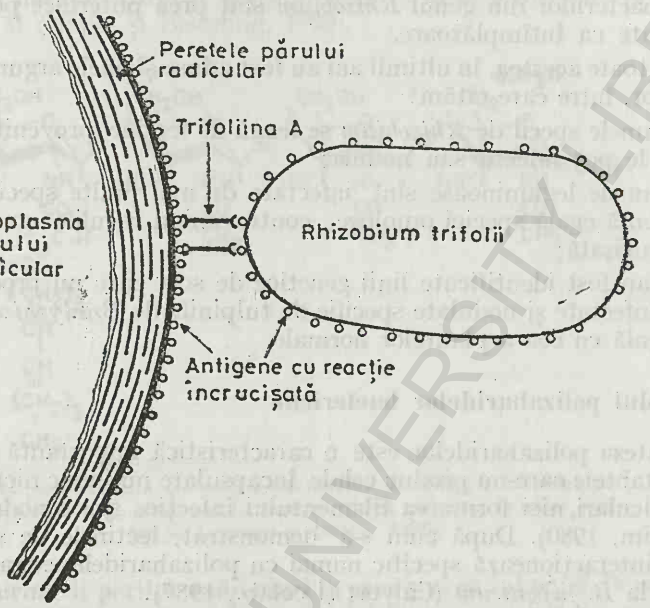



Fig. 110. — Reprezentarea schematică a modului de legare a bacterici *Rhizobium trifolii* pe celulele perilor radiculari ai plantelor de trifoi. După acest model, antigenele glucidice (care reacționează imunologic încrucișat) de pe celulele de *R. trifolii* și cele de pe perii radiculari sînt reunite specific printr-o punte de trifoliină A (lectina de trifoi) (după Dazzo și Hubbell, 1975).

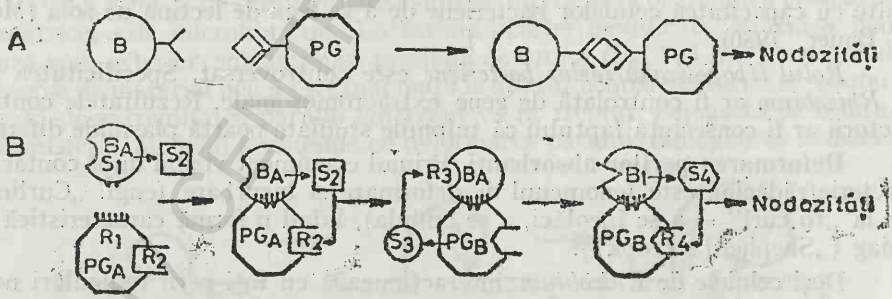



Fig. 111. — Reprezentarea schematică a modului de recunoaștere *Rhizobium* — leguminoase. A. Modelul tradițional, bazat pe participarea lectinelor. B. Modelul lui Bauer, bazat pe o secvență de etape individuale de emitere de semnale ($S_1$ — $S_4$) și răspunsuri ($R_1$ — $R_4$). B = bacterie; L = lectină; PG = plantă-gazdă; $B_A$ și $B_B$ = specii diferite de *Rhizobium*; $PG_A$ și $PG_B$ = specii diferite de plante leguminoase (după Bauer, 1981).

Etapa inițială este prezentată arbitrar de legarea nespecifică a bacteriilor de o celulă-țintă, care declanșează o secvență alternativă de semnale, recepție de semnale și răspuns între simbionți. Asocierea simbiotică și specifici-

tatea globală a procesului de recunoaștere sînt rezultatul cumulativ al mai multor etape individuale de emisie de semnale și de răspuns, care pot fi studiate și caracterizate independent. Relațiile dintre legarea lectinelor și infecțiozitatea bacteriilor din genul *Rhizobium* sînt prea puternice pentru a putea fi considerate ca întîmplătoare.

Cu toate acestea, în ultimii ani au fost aduse și unele argumente împotriva rolului lor, între care citãm:

1) unele specii de *Rhizobium* se leagă de lectine provenite din plante pe care nu le pot infecta sau nodula;

2) unele leguminoase sînt infectate de mai multe specii de *Rhizobium* cu frecvență egală speciei omologe, contravenind regulilor grupelor de inoculare încrucișată;

3) au fost identificate linii genetice de soia care nu produc lectine, dar ele sînt infectate și nodulate specific de tulpinile de *Bradyrhizobium* cu o frecvență egală cu cea a plantelor normale.

### Rolul polizaharidelor bacteriene

Sinteza polizaharidelor este o caracteristică importantă a tulpinilor active. Mutantele care nu produc celule încapsulate nu induc nici deformarea perilor radiculari, nici formarea filamentului infecțios sau a nodulilor (Napoli și Albersheim, 1980). După cum s-a demonstrat, lectinele de soia marcate cu feritină interacționează specific numai cu polizaharidele extracelulare (capsulare) de la *B. japonicum* (Calvert și colab., 1987).

Materialul capsular constă dintr-o unitate pentazaharidică repetată, al cărui „schelet" este format dintr-un rest de manoză, două resturi de glucoză, un rest de acid galacturonic și o catenă laterală formată fie din galactoză, implicată în legarea de lectină, fie din 4-0-metilgalactoză. Raportul dintre galactoză și 4-0-metilgalactoză variază cu vîrsta culturii și explică modificările asociate cu capacitatea celulelor bacteriene de a se lega de lectina de soia (Mort și Bauer, 1980).

*Rolul lipopolizaharidelor bacteriene* este controversat. Specificitatea lor la *Rhizobium* ar fi controlată de gene extracromosomale. Rezultatele contradictorii ar fi consecința faptului că tulpinile studiate poartă plasmide diferite.

**Deformarea perilor absorbanți.** Primul eveniment vizibil după contactul bacterie/rădăcină este fenomenul de deformare și încurbare (engl. „Curling" de la „to curl" = a se încolăci, a se ondula), luînd o formă caracteristică de toiag („Shepherd's crook").

Deși celulele de *Rhizobium* interacționează cu toți perii radiculari nouapăruți, numai aproximativ 25% din ei sînt deformați efectiv, printr-un proces de stimulare locală a creșterii (Bauer, 1981). Specificitatea de gazdă se manifestă chiar din această fază, pentru că deformarea nu este indusă decît de bacteria omologă. Ceva mai mult, specificitatea se manifestă și mai înainte, deoarece bacteriile nu sînt atrase chemotactic în rizosferă decît de flavonoidele capabile să inducă exprimarea genelor *nod*. Long și colab. (1989) au demonstrat că în prezența exsudatelor radiculare și a flavonoidului *luteolina*, *Rhizobium* sintetizează și excretă un factor extracelular produs al genelor *nod*. Factorul produs de *R. meliloti*, descris sub denumirea de *Nod-R*$_m$*-1*, a fost identificat ca un tetrazaharid al D-glucozaminei, sulfatat B-1, 4, în care grupările amino

sînt acetilate, iar una este acilată cu un acid gras C 16 (fig. 112). Datorită caracterului omolog al genelor *nod* comune este, probabil, că acest factor implicat, în mod categoric, în deformarea perilor radiculari ar fi comun tuturor speciilor de *Rhizobium* din natură. Efectul său se manifestă în concentrații variind între $10^{-8}$ și $10^{-11}$ M (Napp și Bisseling, 1990).

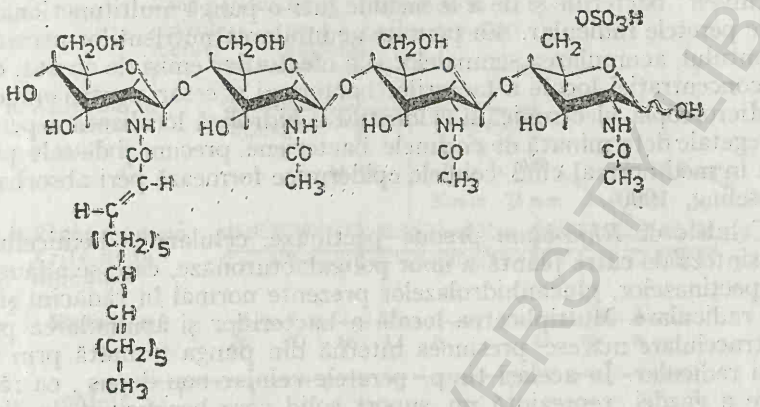


Fig. 112. — Structura chimică a factorului Nod-$R_m$-1 eliberat de *Rhizobium meliloti*, simbiont la lucernă, după inducția genelor *nod* (după Lerouge și colab., 1990).

**Rolul deformării perilor radiculari în producerea infecției.** Bauer (1981) a elaborat un model ipotetic (modelul stratului ß) care explică mecanismul de infectare a celulelor radiculare cu *Rhizobium*. El se bazează pe prezența a două straturi distincte în peretele celular al perilor radiculari: stratul α flexibil și stratul β rigid, situat subiacent (fig. 113). În cursul formării unui păr radicular, la extremitatea apicală a unei celule epidermice are loc îndepărtarea locală a stratului rigid β, fie prin inhibarea sintezei lui, fie prin degradarea enzimatică a matricei sale microfibrilare. La nivelul acestei modificări, stratul α bombează spre exterior, sub acțiunea presiunii de turgor (fig. 113 A). Deoarece depunerea de material nou α este mai mare la apexul hemisferei formate, bacteria legată de extremitatea părului emergent va fi, treptat, deplasată pe o latură a hemisferei. Modelul presupune că deformarea părului radicular se realizează

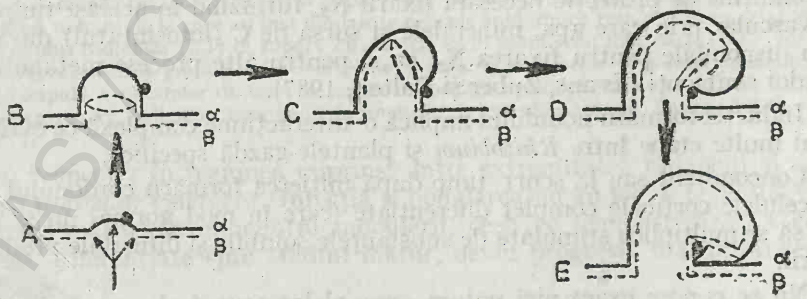



Fig. 113. — Reprezentarea schematică a procesului de inducție a deformării perilor radiculari sub acțiunea bacteriilor din genul *Rhizobium* (după Bauer, 1981).

prin inhibarea depunerii locale a stratului β datorită căreia acesta nu se dezvoltă complet în interiorul stratului α (fig. 113 B). Pe măsură ce părul absorbant crește, extremitatea flexibilă pivotează, treptat, în jurul bacteriei legate, determinînd formarea unei bucle care o acoperă complet (fig. 113 D și E).

După acest model, funcția principală a deformării perilor radiculari este de a „înveli" bacteriile și de a le închide într-o pungă multifuncțională delimitată de peretele radicular. Ea permite acumularea nutrienților necesari microsimbiontului, acumularea semnalelor și a efectorilor emiși de acesta, ca și creșterea concentrației locale a factorilor bacterieni necesari pentru inducția infecției. Microscopia electronică a evidențiat o hidroliză localizată a peretelui celulei vegetale determinată de enzimele bacteriene, precum și de cele produse de plantă în mod normal cînd celulele epidermice formează peri absorbanți. (Nap și Bisseling, 1990).

Celulele de *Rhizobium* produc pectinaze, celulaze și hemicelulaze. Ele induc sinteza de către plantă a unor poligalacturonaze, care se adaugă celulazelor, pectinazelor, glucanhidrolazelor prezente normal în rădăcini și în exsudatele radiculare. Multiplicarea locală a bacteriilor și acumularea produselor lor extracelulare măresc presiunea internă din punga formată prin răsucirea părului radicular. În același timp, peretele celular nou depus , ca răspuns de apărare a gazdei, reprezintă un suport solid care beneficiind de diminuarea rezistenței locale a peretelui celular depolimerizat „împinge" filamentul infecțios, pe cale de formare, împotriva presiunii de turgor a celulelor ce vor fi infectate.

Gradul de deformare a părului radicular depinde atît de plantă, cît și de bacterie. El este maxim cu tulpinile omologe de *Rhizobium*, în urma contactului fizic foarte intim. Deformările mai puțin marcate reflectă o specificitate mai redusă.

## FORMAREA NODOZITĂȚILOR

Nodozitățile sînt rezultatul multiplicării și hipertrofiei anormale, dar limitate, a celulelor corticale stimulate de infecția cu *Rhizobium*. Ele reprezintă nu numai o structură fizică ce asigură bacteriilor nișa ecologică adecvată, ferindu-le de competiția cu alte microorganisme din sol, ci și un organ vegetal înalt diferențiat și organizat, cu caracteristici adecvate scopului. Ele asigură atît condițiile de protecție necesară fixării $N_2$, furnizînd în același timp sistemul vascular prin care apa, mineralele și sursa de C (fotosintatul) din plantă devin disponibile pentru fixarea $N_2$, ca și pentru alte procese metabolice ale celor doi simbionți (Evans, Zuber și Dalton, 1987).

Inducția formării nodulului implică o interacțiune complexă ce evoluează în mai multe etape între *Rhizobium* și plantele-gazdă specifice.

Concomitent sau la scurt timp după inițierea formării cordonului infecțios, celulele corticale complet diferențiate (care în mod normal nu se divid) încep să se multiplice stimulate de substanțele solubile și difuzibile produse de bacterii.

Nu se cunosc exact nici natura semnalelor care declanșează diviziunea celulelor vegetale, nici modul în care ele pot acționa la o distanță de mai multe straturi celulare. Este demonstrat însă, că ele prezintă o specificitate de gazdă, deoarece nu stimulează diviziunea celulelor unei plante heterologe.

**Localizarea celulelor-gazdă infectabile** și decurgînd din aceasta profilul de distribuție a nodozităților a fost studiat de Bhuvaneswari și colab. (1980) în sistemul *B. japonicum*/soia (fig. 114). Ei au observat după 7 zile că majoritatea infecțiilor au loc în regiunea lipsită de peri absorbanți în momentul ino-

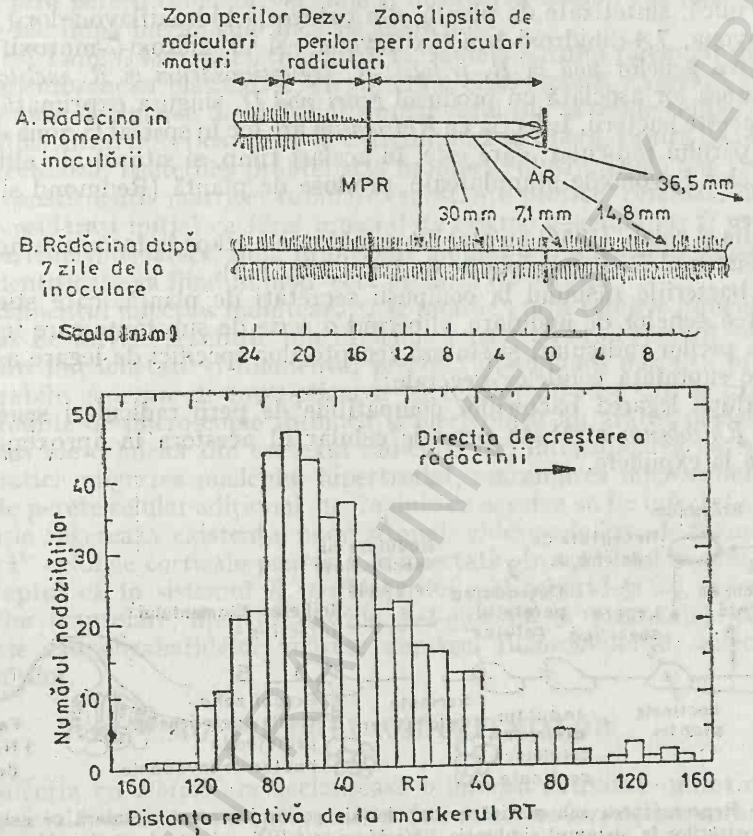



Fig. 114.—Localizarea și dezvoltarea celulelor epidermice din rădăcina plantelor de soia în momentul inoculării **(A)** și după 7 zile de la inoculare **(B)**. Săgețile cu numere indică distanțele la care au fost deplasate celulele epidermice prin alungirea relativă a apexului radicular (RT) în raport cu poziția sa în momentul inoculării (sus). Jos — — reprezentarea grafică a frecvenței de nodulare, în diferite localizări pe rădăcina principală a plantelor de soia în raport cu poziția apexului radicular și a celui mai scurt păr radicular emergent în momentul inoculării (după Bauer, 1981).

culării, respectiv în regiunea cuprinsă între extremitatea rădăcinii și cel mai mic *păr radicular* emergent. Infecția și nodularea nu au loc în regiunile cu peri radiculari maturi în momentul inoculării, ceea ce demonstrează că celulele acestora, diferențiate spre stadiul matur, devin progresiv mai puțin sensibile la infecție.

În alte sisteme *(R. trifolii*/trifoiul alb), regiunile susceptibile la nodulare pot fi diferite, astfel încît regiunile cu peri radiculari maturi, cele cu peri radiculari pe cale de dezvoltare sau chiar lipsite de aceștia pot fi, deopotrivă, susceptibile să fie infectate cu o eficiență mai mică.

Este probabil că în aceste cazuri, situsul de infecție ar fi localizat la baza unui păr absorbant complet dezvoltat, cînd acesta formează o ramificație laterală (Bauer, 1981).

Mulligan și Long (1985) au demonstrat rolul esențial în exprimarea genelor esențiale pentru nodulare de la *Rhizobium* a unor molecule cu greutate moleculară mică, sintetizate de plantă, din categoria hidroxiflavonelor (7,4-dihidroxi-flavona, 7,4-dihidroxi-3-metoxiflavona și 4'-hidroxi-7-metoxiflavona). Exprimarea genelor *nod* la *R. trifolii*, *R. leguminosarum* și *R. meliloti* necesită acțiunea lor asociată cu produsul *genei nod D*, singura exprimată constitutiv la aceste bacterii. Infecția cu *Rhizobium* are loc în special la zona de emergență a părului radicular, care este, în același timp, și situsul de eliberare a substanțelor flavonoide stimulatoare produse de plantă (Redmond și colab., 1986).

Rolfe și colab. (1986) au stabilit următoarele etape în formarea nodozităților în sistemul *R. trifolii*/plante de trifoi (fig. 115):

1) bacteriile răspund la compușii secretați de plantă, care stimulează exprimarea genelor de nodulare, eliberînd o serie de substanțe care induc deformarea perilor radiculari și sinteza receptorilor specifici de legare a lectinelor de pe suprafața celulelor vegetale;

2) după legarea bacteriilor compatibile de perii radiculari sensibili la infecție, *Rhizobium* străbate peretele celular al acestora în aproximativ 24 de ore de la expunere.

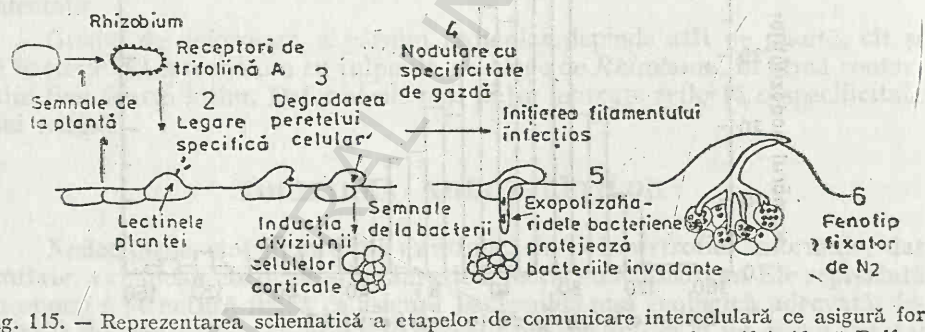



Fig. 115. — Reprezentarea schematică a etapelor de comunicare intercelulară ce asigură formarea nodozităților în sistemul simbiotic *Rhizobium trifolii* — plante de trifoi (după Rolfe și colab., 1986).

Procesul este facilitat de degradarea peretelui celulei vegetale, printr-un mecanism încă incomplet elucidat. Culturile de *Rhizobium*, *in vitro*, convertesc triptofanul la acid β-indolacetic, hormon vegetal care produce „înmuierea" pectatului de calciu din peretele celulei vegetale, prin inducerea extruziei de protoni. Se adaugă, în plus, o slabă activitate pectinazică (poligalacturonazică) ce determină modificări locale ale peretelui celulei părului radicular.

Nucleul celulei infectate migrează spre situsul de pătrundere parietal și, probabil, ca răspuns la perturbarea acestuia, planta începe să sintetizeze cordonul de infecție. Bacteriile protejate de polizaharidele extracelulare înaintează spre cortex, în interiorul cordonului de infecție, în care se multiplică activ. Substanțele difuzibile eliberate de bacterii stimulează multiplicarea celulelor vegetale.

Final, bacteriile „împachetate" în membrane sintetizate de plantă încep, după o perioadă de timp, să fixeze $N_2$ atmosferic.

**Formarea filamentului infecțios.** Filamentul sau cordonul infecțios este o structură tubulară, derivată din celula-gazdă prin care bacteriile dispuse, în general, în șir unic traversează celulele radiculare, pentru a ajunge de la suprafața părului absorbant în cortex, la nivelul primordiului nodulului. Inițierea formării, creșterea lui orientată spre interior, împotriva presiunii de turgor, trecerea prin pereții celulelor vegetale și dizolvarea acestora la momentul potrivit se fac după mecanisme încă necunoscute.

După Lang (1989), bacteriile intră în celulele părului radicular prin invaginarea membranelor plasmatice, iar, ulterior, celula-gazdă formează structura tubulară prin depunerea de material similar celui din peretele celular. Pe măsură ce filamentul infecțios crește la extremitatea sa liberă, lipsită de rezistența dată de celuloză, bacteriile proliferează în interiorul său. După van den Bosch (1989), constituenții matricei tubulare (substanțe pectice, celuloză, hemiceluloză), considerați inițial ca fiind integral de origine vegetală, ar fi produși de ambii parteneri, deoarece, pînă în prezent, numai o componentă glicoproteică a fost identificată ca fiind în mod cert produsă de plantă.

Filamentul infecțios înaintează și se ramifică prin celulele radiculare, impulsionat de forțele rezultate din diviziunea bacteriilor. Frecvent, bacteriile sînt strîns împachetate și filamentul prezintă distorsiuni datorită presiunilor considerabile generate de multiplicarea bacteriilor dispuse cap la cap.

Studiile de microscopie fotonică și electronică au arătat prezența unor modificări ale celulelor din cortexul radicular ca: intensificarea curenților citoplasmatici, migrarea nucleului hipertrofiat, rearanjarea microtubulilor, formarea de perete celular adițional etc. înainte ca acestea să fie infectate. Această observație sugerează existența unor semnale chimice induse de filament, care „prepară" celulele corticale pentru a fi infectate. În sprijinul acestei idei pledează faptul că în sistemul *R. trifolii*/trifoi, polizaharidele de suprafață ale bacteriilor (capsulare, lipopolizaharide, β-2-glucanii și fragmentele oligozaharidice ale exopolizaharidelor) măresc numărul filamentelor de infecție și al nodozităților.

## MORFOLOGIA NODOZITĂȚILOR

Infecția cu *Rhizobium* declanșează o intensă activitate mitotică a celulelor vegetale, care are drept rezultat formarea nodozităților caracteristice. Nodozitățile integral dezvoltate au o structură caracteristică, alcătuită din mai multe regiuni și subregiuni structural și funcțional diferite (Blondeau, 1980; Nap și Bisseling, 1990).

**Regiunea periferică** este reprezentată de cortexul nodozității alcătuit din mai multe straturi de celule diploide mai mici și mai compacte decît cele ale cortexului radicular. Lipsit de bacterii, acest înveliș, care acoperă suprafața nodozității, este străbătut de fascicule vasculare rudimentare.

**Zona meristematică**, situată în regiunea distală a nodozității, este formată, de asemenea, din celule diploide neinfectate. Ele asigură prin diviziune atît creșterea nodozităților, cît și forma lor (meristemele emisferice generează nodozități cu formă sferică, cele apicale nodozități alungite, iar cele bifurcate nodozități ramificate).

**Regiunea centrală** este alcătuită din trei zone distincte, ce se succed de la zona meristematică spre baza nodozității, legată de părul absorbant:

— *Zona de invazie*, imediat adiacentă meristemului, este formată din celule neinfectate și celule mărite de volum, care au endocitat proporții egale de

bacterii eliberate din cordonul infecțios. Celulele bacteriene cu forme alungite și puține materiale de rezervă continuă să fie eliberate din cordonul infecțios și să se multiplice.

— *Zona simbiotică*, ocupînd porțiunea majoră a nodozității, este alcătuită din două subzone:

*Zona simbiotică timpurie*, care conține celule vegetative alungite (axul lung 38—62 μm) și bacterii care încă mai proliferează și

*Zona simbiotică tardivă*, conținînd celule vegetative hipertrofiate poliploide încărcate, în diferite grade, cu bacterii diferențiate la stadiul de bacteroizi. Celulele vegetale din această zonă, în care are loc fixarea $N_2$, au nucleu hipertrofic și conțin un număr mărit de mitocondrii, plastide și poliribosomi. Volumul lor mediu este aproximativ la $10—12 \times 10^{-5}$ mm³. Ele au interfețe de contact cu alte celule încărcate cu bacteroizi (~ 20—60% din suprafață) cu alte celule interstițiale (~20—46%) și cu 5—7 spații intercelulare pline cu gaze (20—35%). Interfețele cu celulele interstițiale servesc pentru schimbul de substanțe dizolvate, iar cele cu spațiile intercelulare asigură schimbul de gaze ($O_2$, $N_2$, $CO_2$) (Nap și Bisseling, 1990).

— *Regiunea de senescență*, caracteristică nodozităților bătrîne, corespunde celulelor vegetale și bacteroizilor în curs de degenerare sau moarte. O nodozitate în vîrstă de 30 de zile conține aproximativ $2,3 \times 10^5 (\pm 0,25 \times \times 10^5)$ celule infectate, care ocupă 78% din volumul țesutului cortexului (Nap și Bisseling, 1990).

### Eliberarea bacteriilor din cordonul infecțios

După ce filamentul infecțios a străbătut o serie de straturi ale cortexului radicular are loc eliberarea bacteriilor, fie în spațiile intercelulare, fie în interiorul celulelor meristematice ale viitoarei nodozități. Eliberarea este un proces activ, inițiat fie de bacterii, fie de plante. Bacteriile eliberate evoluează spre stadiul de bacteroid și sînt învelite de o membrană peribacteroidiană generată de celula-gazdă. Mutantele de *Bradyrhizobium* neeliberate din coordonul infecțios sînt degradate în interiorul acestuia.

*Bacteroizii*. După eliberarea din cordonul infecțios în citoplasma celulei vegetale, celulele de *Rhizobium* se diferențiază în forme endosimbiotice — *bacteroizi* — care au proprietatea de a fixa $N_2$. Procesul este corelat cu modificările structurale și fiziologice ale nodozităților radiculare.

Numărul bacteroizilor/celulă vegetală este variabil. Este relativ mic (aproximativ 1000 de bacterii/celulă vegetală, la *R. trifolii* și la celelalte specii la care multiplicarea încetează relativ timpuriu după infecție) și foarte mare ($3—4 \times 10^4$) în sistemul *B. japonicum*/soia. După Beringer și colab. (1979), numărul bacteriilor ar fi influențat și de genotipul gazdei.

Bacteroizii sînt celule cu un perete celular subțire și mai puțin rigid. Această modificare favorizează trecerea nutrienților din citosolul vegetal în bacteroid și a $N_2$ fixat din acesta în plantă. Pe lîngă mărirea de volum (pînă la de 40 de ori dimensiunile celulelor libere), bacteroizii unor specii au forme sferice, poliedrice, piriforme sau asemănătoare literelor X sau Y, ca rezultat al tasării reciproce a unor celule cu perete celular subțire.

Sînt, în același timp, celule foarte specializate funcțional: conțin sistemele enzimatice ale nitrogenazei, leghemoglobină și sînt în măsură să desfășoare ansamblul reacțiilor asociate cu fixarea $N_2$ și conversia lui la $NH_4^+$.

Conțin, de asemenea, mari rezerve de poli-β-hidroxibutirat și glicogen, necesare pentru asigurarea metabolismului bacterian cînd aportul de fotosintat este insuficient.

Se estimează că fiecare bacteroid fixează *in vivo* aproximativ $1,0 \times 10^{-18}$ moli $NH_3$/minut. Nodulii de soia conțin 3,6 μmoli $NH_3$/g greutate proaspătă, din care aproximativ 1/2 este N nou fixat.

După eliberare în sol, din nodozitățile senescente, bacteroizii revin la forma inițială și sînt capabili să reia multiplicarea. În felul acesta, stadiul de endosimbiont reprezintă doar o fază din ciclul lor de viață (fig. 106).

## FIZIOLOGIA SIMBIOZEI

Există puține probe că *Rhizobium* ar fixa $N_2$ în cantități semnificative în absența plantelor. În general, tulpinile de *Rhizobium* care trăiesc liber nu conțin nitrogenază (Guerinot și Chelm, 1987). Fixarea $N_2$ necesită, deci, prezența plantelor și este, în mare măsură, sub controlul acestora, exercitat la mai multe nivele.

Plantele reprezintă sursa finală de energie și de putere reducătoare. În plus, compușii cu C proveniți de la plante furnizează structura necesară pentru încorporarea azotului nou fixat și pentru transportul lui în diferite regiuni ale plantei. Rata fixării $N_2$ este afectată de factorii care influențează fotosinteza. Scăderea intensității luminii sau a fotosintezei prin defoliere parțială determină scăderea capacității de fixare a $N_2$.

*Metabolismul C* în nodul este incomplet elucidat. Compusul major transportat din frunză la nodul este zaharoza, care nu este folosită direct, ca atare, ci este prealabil hidrolizată de o invertază de origine vegetală.

După Rainbird și colab. (1981), susținerea sistemului fixator de $N_2$ în cursul perioadei sale de activitate maximă necesită utilizarea a aproximativ 22% din cantitatea netă de fotosintat produs de plantă. La *Pisum* sp. ar fi translocat în nodul pînă la 32% din fotosintat, din care 5% ar fi utilizat pentru creșterea acestuia, 12% pentru respirație, iar 15% ar fi înapoiat în plantă, pe calea xilemului, sub formă de compuși de transport azotați.

*Metabolismul N*. Procesul de fixare a azotului este efectuat de celulele bacteriene care conțin sistemele enzimatice necesare, codificate de genele *nif* și *fix*. Între acestea, enzima esențială, *nitrogenaza* — molecula-cheie, universal folosită de toate organismele fixatoare de $N_2$*.

Produsul principal al fixării este $NH_3$ care este excretat de bacteroizi în citosolul vegetal, unde este convertit la glutamină, asparagină și o serie de alți aminoacizi. Procesul implică reacțiile cuplate ale glutaminsintetazei și glutamatsintetaze i, a căror concentrație în noduli este de cîteva ori mai mare decît în rădăcină.

$N_2$ redus la $NH_3$, sub acțiunea nitrogenazei, este preluat de glutaminsintetază, care transferă gruparea amino, fie la aspartat cu formare de asparagină, fie la α-cetoglutarat (produs pe calea ciclului Krebs de la glucoză) pentru a forma glutamat (fig. 116). Asparagina, glutamina și glutamatul reprezintă surse importante de azot pentru plante.

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 227.

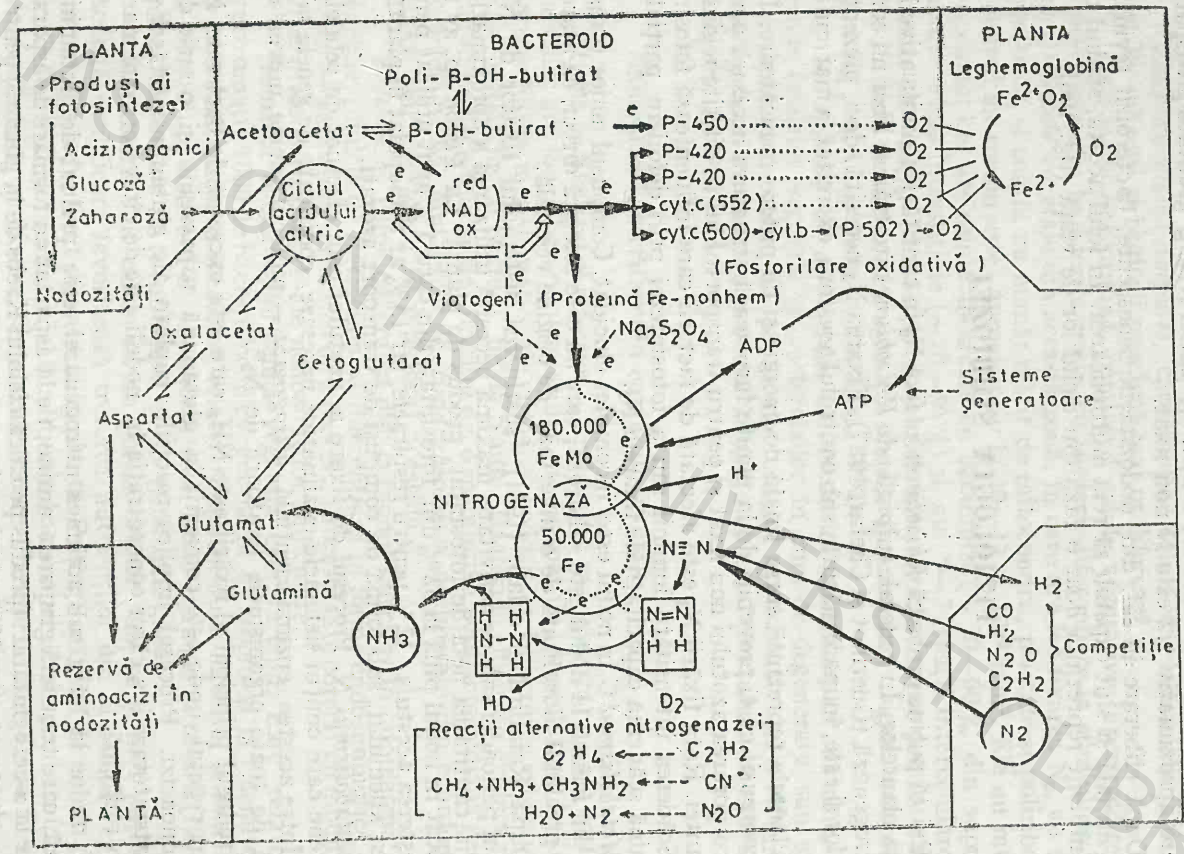



Fig. 116. — Reprezentarea schematică a mecanismelor moleculare asociate cu procesul de fixare a azotului molecular. Liniile punctate indică acțiunea asupra unor materiale și reacții observate în preparate acelulare. Liniile întrerupte indică prezența probabilă a terminal oxidazelor minore (după Bergersen, 1979).

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un grup de celule înalt specializate, care înconjură elementele xilemului radicular, funcționează ca glande secretorii, eliberînd diferiții produși ai fixării în xilem, de unde sînt transportați în diferite regiuni ale plantei.

## BAZELE GENETICE ALE SIMBIOZEI DIAZOTROFE

Lectinele sînt foarte importante pentru legarea bacteriilor de perii radiculari, dar infecția necesită și intervenția altor fenomene de recunoaștere, precum și prezența și activitatea unor enzime hidrolitice, a factorilor de deformare a perilor radiculari etc. Ca probă este faptul că un hibrid al bacteriei *Azotobacter vinelandii*, care poartă receptori de *trifoliină X* (prin transformare genetică cu ADN de la *R. trifolii)* aderă specific, dar nu infectează plantele de trifoi.

Un rol fundamental în evoluția simbiozei îl au interacțiunile dintre *Rhizobium* și plantele leguminoase corespunzătoare care își potențează mutual unele din proprietățile genetice individuale (Sprent, Sutherland și De Faria, 1987).

Ca urmare, plantele produc, ca răspuns la infecția cu *Rhizobium noduline*, iar *Rhizobum*, ca răspuns la gazdă, *bacteroidine*. Apar astfel o serie de produși al căror rol se adaugă forțelor naturale electrostatice, curenților de ioni endogeni etc., al căror efect de atracție între cei doi parteneri ar putea fi mai mare decît cel al lectinelor.

### Genele bacteriene pentru nodulare

Utilizarea unor tehnici genetice complexe a permis identificarea la tulpinile de *Rhizobium* a unor gene implicate în stabilirea unei simbioze eficiente, respectiv în formarea nodulului și în exprimarea genelor plantei pentru noduline. Ele pot fi grupate în trei categorii:

1) genele pentru nodulare *(nod)*;

2) genele implicate în formarea unor structuri de suprafață externă ale bacteriilor: *exp* (pentru exopolizaharide), *lps* (lipopolizaharide) și *ndv* (glucani ciclici);

3) un număr mic de gene nedefinite.

În plus, la unele tulpini de *Rhizobium* au fost identificate gene cromosomale *(chr A, chr B)* de virulență, asemănătoare celor descrise la *Agrobacterium tumefaciens*.

Genele *nod*, ca și genele pentru fixarea $N_2$, sînt localizate la tulpinile de *Rhizobium* pe plasmide mari „simbiotice" *(pSym)*, iar la *Bradyrhizobium* pe cromosom. În ansamblu, deși funcțiile lor globale nu sînt încă identificate, ele ar produce semnale care stimulează formarea cordonului infecțios și a nodulului. Transferul lor la o tulpină nenodulantă de *A. tumefaciens* o face capabilă să infecteze gazda specifică a tulpinii de *Rhizobium* donatoare și să inducă nodularea. Aceasta demonstrează că, pe lîngă funcția lor de bază, de nodulare, genele *nod* sînt și un determinant major al specificității de gazdă (Kean și Staskawiecz, 1988).

Au fost studiate mai ales la *R. leguminosarum*, *R. trifolii* și *R. meliloti* la care localizarea, structura, funcția și reglarea lor sînt foarte asemănătoare. La *R. trifolii*, *R. leguminosarum* și *R. meliloti* ar exista de la șase pînă la zece gene necesare pentru nodulare, cele identificate formînd secvența *nod ABCDEF* de 14 kb, dispusă în structura plasmidei *pSym* de 180 kb (Hooykaas și colab., 1981).

Din punct de vedere funcțional pot fi grupate în trei clase:

1) *Genele nod comune*, conservate la toate speciile de *Rhizobium*, sînt structural similare și includ, printre altele, genele operonului *nod ABC*. Au fost izolate, cartate, secvențializate și clonate (Dowling și Broughton, 1986). Ele sînt funcțional echivalente, indiferent de specia de la care provin. Mutația la nivelul lor anulează capacitatea de nodulare. fapt care demonstrează rolul lor fundamental în acest proces. După Wijpfelman (1986), ar fi implicate în deformarea părului absorbant (gene *Hac* de la engl. *Hair curling*). Inducția lor necesită participarea produsului genei *nod D* și a exsudatului radicular. Nu sînt funcționale în mediile de cultură standard.

2) *Genele specifice de gazdă* determină nodularea specifică a unei anumite plante. Mutația la nivelul lor reduce sau întîrzie nodularea și modifică spectrul de gazde. Deși pot avea anumite secvențe conservate, nu se pot înlocui funcțional reciproc între diferitele specii.

3) *Gena nod D*, prezentă în mai multe copii, la unele specii este exprimată constitutiv. În asociere cu substanțele flavonoide elaborate de planta-gazdă, excretate de rădăcinile acesteia, reglează activitatea genelor *nod ABC*, proteina *Nod D* acționînd ca activator al transcrierii acestora. Ea răspunde cel mai bine la flavonoidele gazdei omologe și este, ca atare, și un factor determinant al specificității.

### Genetica nodulinelor

Nodulinele sînt proteine sintetizate de planta-gazdă în cursul formării și funcționării nodulului radicular. Au fost descrise cel puțin 25 de gene pentru noduline, dar funcția produșilor lor este încă puțin cunoscută. Genele pentru noduline sînt activate de un semnal reprezentat, probabil, de eliberarea bacteriilor din cordonul de infecție. Ele nu se exprimă în nodulii care nu conțin celule infectate.

În funcție de momentul exprimării genelor respective, în raport cu stadiul de dezvoltare și de activitate fiziologică a nodulilor, au fost descrise două tipuri de noduline:

*Nodulinele timpurii*, codificate de un număr relativ restrîns de gene, sînt implicate în procesul infecțios și în dezvoltarea structurii nodulului. Sînt proteine bogate în prolină. Inducția exprimării lor și a diferențierii celulare este, probabil, sub controlul partenerului bacterian.

*Nodulinele tardive* sînt codificate de un număr mare de gene, a căror exprimare este tardivă, respectiv după ce structura nodulului este completă, avînd toate caracterele definitorii. Cele mai studiate noduline tardive sînt enzime ca glutaminsintetaza, uricaza sau subunități de enzime ca sucrozsintetaza. Prezența lor asigură condițiile fiziologice necesare pentru fixarea $N_2$, asimilarea $NH_3$ și transportul în plantă (Nap și Bisseling, 1990). Unele noduline tardive sînt asociate cu membrana peribacteroidiană, formînd o interfață fizică și metabolică între bacterii și plante.

Nodulina Ngm-26 de la soia este o proteină transmembranară, care formează un canal ionic ce asigură translocația compușilor cu g.m. unică (ex. succinatul) prin membrana peribacteroidiană.

După Halverson și Stacey (1986), există două categorii de noduline:

1) *Nodulinele comune* (c-nodulinele) sînt implicate în procesul fixării $N_2$ și sînt comune tuturor nodulilor.

2) *Nodulinele specifice* (s-nodulinele), caracteristice de specie, au rol în metabolismul C și N în nodul.

Astfel au fost descrise o uricază specific nodulară (N-35), diferită de cea radiculară, și mai multe noduline specifice lucernei, diferite de cele de la mazăre.

În cursul simbiozei, cei doi simbionți pot sintetiza *de novo* și alți compuși diferiți de noduline și bacterodine.

Astfel, plantele pot sintetiza *luteolină* (derepresează unele gene *nod.)*, gliceolină (stopează la soia reacția gazdei la endofit), *rizolotina* (metabolizată de *R. loti*, simbiont cu *Lotus tenuis)*.

În mod asemănător, *Bradyrhizobium japonicum* produce *rhizobina* și *rhizobioxina*, care induc cloroza foliară a plantei-gazdă.

*Leghemoglobina* (Leghb), singura cromoproteină de tip hemoglobinic din regnul vegetal, este alcătuită dintr-un grup prostetic protoporfirinic și o proteină (globina) prezentă în citoplasmă și/sau în spațiul învelișului membranar. Este o proteină simbiotică: genele pentru globină sînt prezente în celula vegetală și se exprimă numai după infecția specifică, iar gruparea hem este produsă de *Rhizobium*, în condițiile de microaerofilie din nodul. La soia poate ajunge pînă la 40% din proteina solubilă totală din nodul, ceea ce corespunde la o concentrație intracelulară de 0,8 mM (Bergmersen, 1979).

Compus esențial al sistemului simbiotic, Leghb are o mare afinitate pentru $O_2$ liber a cărui concentrație *in vivo* este de $1 \times 10^{-8}$M. Ea leagă $O_2$ și participă la procesul de difuzie facilitată în care $O_2$ de la exteriorul nodulului este transferat la bacteroizi la o concentrație suficient de ridicată pentru a favoriza metabolismul oxidativ și, în același timp, suficient de scăzut (aproximativ 10 nanomoli) pentru a nu inactiva complexul nitrogenazic. La suprafața bacteroidului, $O_2$ disociat foarte lent de la oxiLeghb este acceptat de un sistem oxidazic terminal cu o afinitate extrem de scăzută pentru $O_2$ (Appleby, 1984).

### Protecția față de oxigen

Nitrogenaza ($N_2$aza) este inactivată ireversibil, sinteza ei fiind reprimată de prezența $O_2$, chiar dacă provine de la organisme aerobe. În simbioza diazotrofă, $O_2$ este necesar pentru metabolismul respirator al bacteriilor, dar, în același timp, prezența sa poate inactiva ireversibil complexul $N_2$azei esențial pentru fixarea $N_2$.

Pentru asigurarea unui echilibru între aceste două exigențe în conflict, microorganismele fixatoare de $N_2$, în general, au dezvoltat o serie de strategii anatomice, fiziologice și biochimice. Între acestea sînt de amintit: sinteza de substanțe mucoide care încetinesc difuzia $O_2$ la situsurile sensibile *(Beijerinckia, Derxia, Azotobacter)*, prezența unui metabolism respirator neobișnuit de intens sau a unei rețele de membrane intracelulare *(Azotobacter* sp.) sau a unor celule specializate (heterochiști) cu perete celular gros, lipsite de sistemul fotosintetic II, indispensabil pentru eliberarea $O_2$.

Nodulul plantelor leguminoase funcționează ca un organ vegetal înalt organizat în care masa de bacteroizi, care poate forma pînă la 30% din greutatea totală a celulelor, este formată, de regulă, de pachete individuale de 3—4 celule, înconjurate de membrane care împiedică difuzia liberă a $O_2$ (Guérinot și Chelm, 1987).

### Factorii care afectează nodularea

Rezultatul inoculării artificiale a plantelor cu *Rhizobium* sp. este influențat de mai mulți factori. Cunoașterea lor este importantă pentru succesul acțiunilor de fertilizare cu ajutorul preparatelor bacteriene.

1) *Numărul și proveniența bacteriilor.* Frecvența nodulării este corelată cu cantitatea de *Rhizobium* din inocul și cu proporția tulpinilor indigene. Weaver și Frederick (1974), lucrînd cu soia *(Glycine hispida)*, au demonstrat că nodularea a 50% din plante necesită de 1000 de ori mai multe bacterii provenite din culturi de colecție decît din mediu. Superioritatea tulpinilor indigene ține de adaptarea lor la condițiile din sol unde trăiesc ca saprofiți.

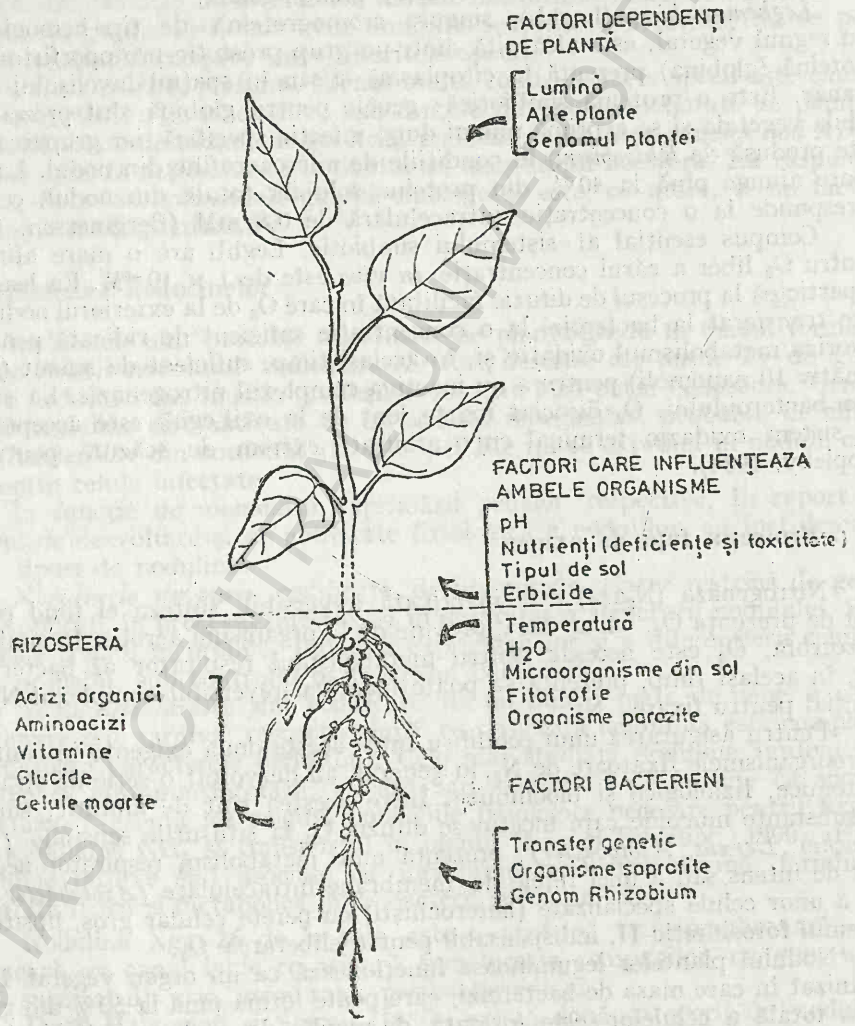



Fig. 117. — Reprezentarea schematică a factorilor care pot influența evoluția competiției tulpinilor de *Rhizobium* pentru infecția și „nodularea" leguminoaselor (după Dowling și Broughton, 1986).

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Ca dovadă este faptul că tulpinile de *Bradyrhizobium*, izolate din regiunile aride, sînt mai tolerante la uscăciune și la temperaturi ridicate decît cele izolate din regiunile reci și umede.

2) *Structura genetică a plantelor, intensitatea fotosintezei și prezența altor plante în același habitat* au, de asemenea, consecințe importante asupra nodulării. Leguminoasele purtătoare de micorize veziculoarbusculare fac simbioze mult mai eficiente.

3) *Factorii de mediu* exercită o acțiune complexă atît asupra bacteriilor cît și asupra plantelor prin intermediul unor factori fizici, chimici și biologici ca: temperatura, variațiile de pH, salinitatea, deficitul în nutrienți, prezența de substanțe toxice, utilizarea anterioară a solului etc.

În acest cadru s-a demonstrat că temperaturile ridicate din cursul verii pot explica incapacitatea de nodulare de către unele tulpini de *Rhizobium* din sol. Unele tulpini nodulează optim la 12°C, altele la 25°C și evident tulpinile cu metabolism adaptat la o anumită temperatură pot competiționa cel mai bine la temperatura respectivă.

În mod asemănător, tulpinile sensibile la un pH scăzut nodulează mai greu decît cele tolerante.

Factorii biologici exercită un rol esențial prin natura și numărul microorganismelor indigene, prezența unor microorganisme prădătoare *(Bdellovibrio* sp.), a protozoarelor bacterivore sau a unor bacterii epifite *(Erwinia herbicola)*, care produc toxine, blochează situsurile de legare ale celulelor de *Rhizobium* și suprimă nodularea.

Fagii virulenți scad numărul tulpinilor sensibile, în timp ce cele rezistente nodulează bine. După Dowling și Broughton (1986), se pare că există un situs comun de interacțiune bacterii/fag și bacterii/plante, care explică corelația dintre sensibilitatea sau rezistența la fag și simbioză.

Figura 117 prezintă sintetic ansamblul factorilor ecologici care pot influența evoluția competiției tulpinilor de *Rhizobium* pentru nodulare.

### Reglarea simbiozei

Instalarea și funcționarea simbiozei diazotrofe sînt procese riguros reglate. Reglarea implică schimbul de semnale chimice specifice între partenerii simbiotici, în mare parte ca rezultat al modificărilor induse în mediul fiziologic. În general, prezența N combinat în mediu limitează evoluția simbiozei, prin blocarea procesului de recunoaștere și inhibarea efectelor morfogenetice ale procesului de nodulare. Experimental s-a demonstrat că legarea specifică a *R. trifolii* de perii radiculari, ca și concentrația trifoliinei A pe celulele epidermice scad paralel cu creșterea concentrației $NO_3^-$ de la 1 mM la 15 mM (Dazzo și Brill, 1978; Truchet și Dazzo, 1983) (fig. 118). Cantitatea de trifoliină A în exsudatul radicular este de 30 de ori mai mare cînd planta crește fără N combinat, decît în prezența a 15 mM $NO_3^-$.

În plus, nodularea este autoreglată și optimizată prin activitatea plantei-gazdă:

1) nodularea este stimulată prin excizia nodulilor formați anterior, ceea ce sugerează că nodulii existenți ar produce o substanță inhibitoare a formării de noi noduli;

2) nodulii ineficienți (care nu fixează $N_2$) sînt mai numeroși decît cei eficienți;

3) multe infecții cu *Rhizobium* sînt abortive, probabil tot ca o manifestare de autoreglare a numărului de noduli.

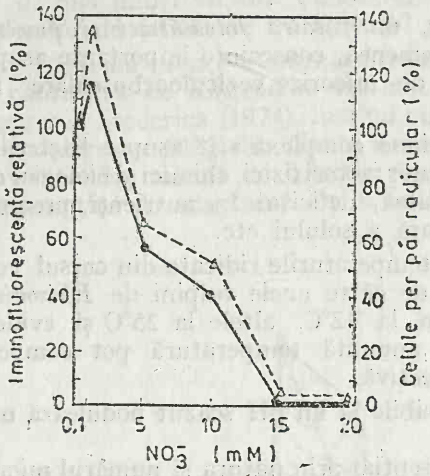



Fig. 118. — Efectul $NO_3^-$ asupra adsorbției bacteriei *Rhizobium trifolii* 0403 pe suprafața perilor radiculari (—) și pe trifoliina A detectată imunologic (— — —), în regiunea perilor radiculari ai plantelor de trifoi. Adsorbția bacteriilor a fost stabilită prin numărătoare directă, iar trifoliina a fost măsurată prin citofluorometrie, utilizînd imunofluorescența indirectă. Datele sînt corectate pentru adsorbția nespecifică a rizobiilor, pentru autofluorescența rădăcinii, ca și pentru absorbția nespecifică a conjugatelor de gamaglobulină de capră anti-iepure (după Dazzo și Brill, 1978).

**Semnificația biologică.** Simbioza diazotrofă *Rhizobium*/leguminoase este rezultatul unui proces complex de dezvoltare, coordonat de mecanisme genetice aparținînd atît bacteriilor, cît și plantelor. El asociază capacitatea de fotosinteză a plantelor cu cea de reducere a $N_2$ la $NH_4$.

Esența simbiozei constă în comunicarea metabolică și schimbul de metaboliți între cei doi simbionți (fig. 119). După Verma (1983), simbioza

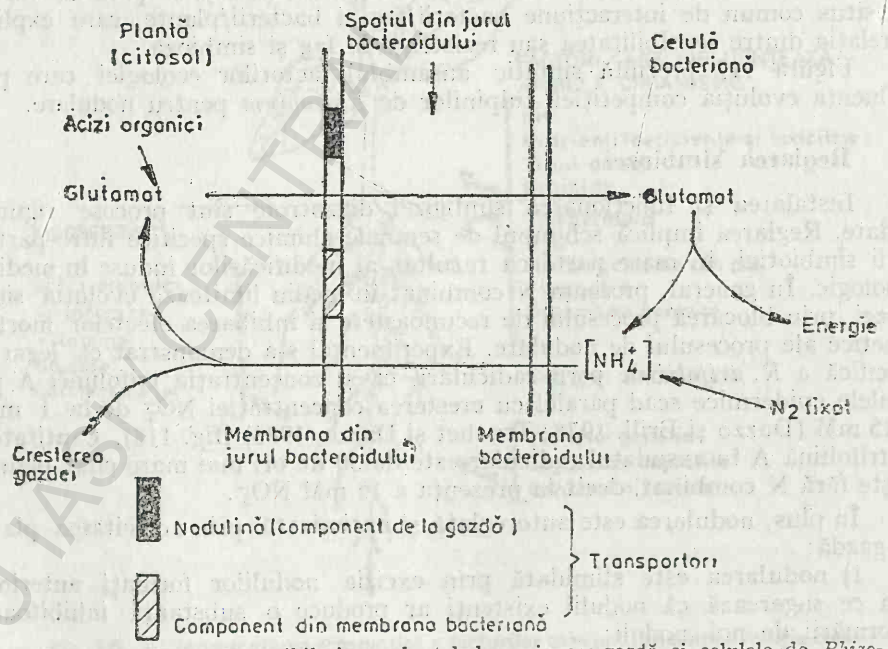



Fig. 119. — Relațiile posibile între plantele leguminoase-gazdă și celulele de *Rhizobium*. Glutamatul menționat în schemă este numai una din numeroasele surse de N posibile (după Sprent, Sutherland și De Faria, 1987).

ar evolua ca o boală benefică a plantelor. Fac excepție, tulpinile ineficiente de *Rhizobium*, care nu aduc beneficii asocierii, profitînd însă de localizarea lor la nivelul rădăcinii, pentru a folosi nutrienți din structura acesteia. În acest caz, simbioza devine ușor parazitară, deși lezarea plantei este minimă.

Pe plan biologic general, fenomenul demonstrează că linia de demarcație dintre mutualism și parazitism este relativ mobilă, putînd fi trecută, în funcție de diferiți factori, fie într-un sens, fie în celălalt.

## ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA SIMBIOZEI DIAZOTROFE

În absența unor înregistrări fosile, concludente, concepțiile privind modul de apariție al simbiozei leguminoaselor sînt pur ipotetice.

Cele mai vechi leguminoase fosile ar putea fi clasificate ca *Eucaesalpiniodeae*, care conțin atît specii nodulate, cît și nenodulate. Ele sugerează că nodularea a apărut timpuriu în dezvoltarea familiei.

Mai mulți autori sugerează că primele plante nodulate au fost mai degrabă lemnoase decît ierboase, iar alții consideră chiar că simbioza ar fi avut un anumit rol în individualizarea leguminoaselor.

După unii cercetători, simbioza ar fi apărut foarte timpuriu și relativ brusc, probabil chiar într-o etapă unică, fapt care ar explica limitarea ei la un singur ordin de plante-gazdă *(Fabales* sau *Leguminosales)*. Ei admit că sistemul nitrogenazic a avut inițial alte funcții (neutralizarea toxicelor de tip cianuri, cianogen), deoarece prezența lui nu oferă organismelor posesoare nici un avantaj selectiv. Este probabil că a fost inițial foarte răspîndit și a fost pierdut pe măsură ce atmosfera planetei a devenit tot mai oxigenată (Postgate, 1974, 1982).

După Sprent, Sutherland și de Faria (1987), acest eveniment s-ar fi produs la scurt timp după ce bacteriile au început să fixeze $CO_2$ (pe căi neproducătoare de $O_2$) și cînd sursele de N combinat ($NH_3$, $NO_x$), nebiologic, au devenit insuficiente pentru a asigura dezvoltarea unor organisme simple, avînd un raport C/N aparent fix (3: 6). Faptul că unele bacterii metanogene *(Archaebacteria)* fixează $N_2$ este în acord cu ideea unei origini foarte vechi (Murray și Zinder, 1984).

După Nutman (1963), simbioza ar fi început ca o asociere a unor bacterii libere fixatoare de $N_2$ cu rădăcinile plantei, iar infectarea acesteia și diferențierea nodulului s-ar fi produs în etape ineficiente, structural incomplete și fiziologic defective, avînd caracter de forme degenerate, ceea ce nu exclude ipoteza unei origini parazitare.

În favoarea unei origini recente pledează distribuția oarecum la întîmplare a operonului de gene *nif* la diferite tipuri de bacterii, inclusiv la *Klebsiella pneumoniae*, lipsa unei divergențe evolutive printre proteinele $N_2$azei de la diferitele organisme și limitarea ei la procariote, întrucît celulele eucariote sînt foarte aerobe. În felul acesta, asocierea fixării $N_2$ cu unele caractere primitive s-ar baza mai mult pe o coincidență. Fixarea biologică a $N_2$ este limitată la procariote, iar în sistemele naturale, plantele recurg la simbioza diazotrofă cînd sînt în prezența unui deficit major de N, în timp ce animalele, beneficiind de modalități complexe de obținere a hranei și de sisteme de eliminare a reziduurilor, nu recurg la această modalitate de nutriție azotată.

Prezența microorganismelor fixatoare de $N_2$ la unele organisme animale (termite, porc, om) este asociată cu condiții speciale de hrană, ca, de exemplu, dieta prelungită cu exces de C și conținut foarte scăzut în N (spre exemplu, la om alimentarea îndelungată cu cartoful dulce *Ipomoea batata)*. În aceste cazuri, beneficiul este, de regulă, dirijat spre microsimbiont.

## SIMBIOZA *RHIZOBIUM* — LEGUMINOASE TROPICALE

Unele leguminoase tropicale prezintă atît noduli radiculari, cît și noduli caulinari (lat. caulis — tulpină).

La *Sesbania rostrata*, nodulii sînt aliniați regulat de-a lungul ramurilor și se dezvoltă pînă la vîrful plantei atît pe ramurile principale, cît și pe cele secundare. La *Aeschynomene afraspera* sînt dispuși mai neregulat. Infecția se produce la situsuri predeterminate, constituite dintr-un rudiment de rădăcină care perforează epidermul, formînd o mică proeminență, numită *mamelon caulinar* (fig. 120). Bacteriile aduse de ploaie, insecte sau praf infectează plantele la nivelul unor fisuri circulare, situate la punctul de emergență al rudimentului radicular.

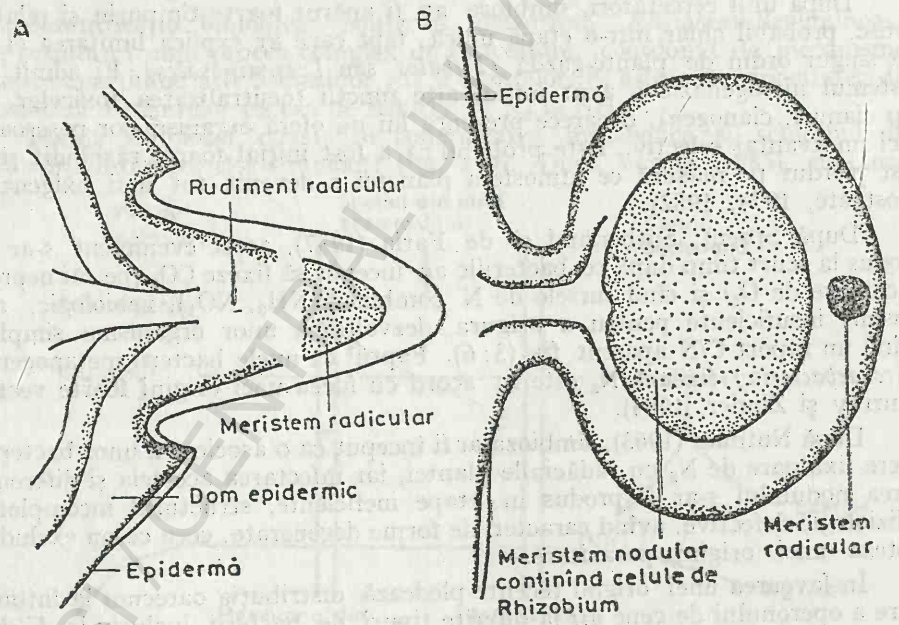



Fig. 120. — Reprezentarea schematică a modului de formare a nodozităților după infecția plantelor leguminoase tropicale cu *Rhizobium*. **A.** Mamelon caulinar înainte de infecția cu *Rhizobium*. **B.** Nodozitate caulinară după 10 zile de la infecția cu *Rhizobium* (după Dommergues și colab., 1985).

Ele se multiplică formînd inițial pungi de infecție intercelulare, în vecinătatea cărora prin multiplicarea anumitor celule din stratul intern al cortexului se formează un meristem indus de un mediator chimic încă neidentificat (Dommergues și colab., 1985). Celulele de *Rhizobium* din zonele

intercelulare formează cordoane de infecție care se alungesc, pătrund în celulele derivate din meristem și se transformă în bacteroizi fixatori de $N_2$, acoperiți de o membrană peribacteroidiană. Nodulii au formă globulară și un ∅ de 3 mm. Fixarea $N_2$ la nivelul lor, estimată la 200 kg N/ha/an, nu este influențată de cantitatea de $NO_3^-$ prezent în sol.

Se apreciază că în Senegal prin îngroparea plantelor înainte de însămînțare acest tip de simbioză diazotrofă, premergătoare culturilor, dublează sau triplează producția de orez.

Dommergues și colab. (1985) apreciază că transferul capacității de nodulare caulinară la alte leguminoase prin tehnici de inginerie genetică ar putea mări randamentul fixării $N_2$ și rolul lor fertilizator.

## SIMBIOZELE ASOCIATIVE
## FIXAREA AZOTULUI ÎN RIZOSFERĂ

*Rizocenozele* reprezintă asocieri cu diferite grade de intimitate între unele bacterii fixatoare de azot libere și diferite specii de plante. Semnificația bacteriilor asociate a fost semnalată prima dată de Dobereiner și Day (1976), iar Tarrand și colab. (1978) le-a clasificat în genul *Azospirillum*.

În geneza acestor simbioze speciale, un rol esențial îl are faptul că în regiunile tropicale în special, rizosfera unui număr mare de graminee spontane sau de plante de cultură reprezintă un habitat ideal pentru dezvoltarea bacteriilor heterotrofe fixatoare de azot. Substanțele organice provenite din resturile celulelor radiculare și exsudatele solubile ale rădăcinii sînt preluate preferențial de către simbiont ca sursă de C și de energie.

Cel mai mult studiate sînt asocierile descrise la porumb, grîu, orz, trestia de zahăr, precum și la o serie de graminee furajere tropicale.

Microorganismele implicate în acest tip de simbioze sînt: 1) *Azospirillum lipoferum* (numit inițial de Beijerinck, 1922 *Spirillum lipoferum*), *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*; 2) *Azobacter paspali*; 3) *Beijerinckia* sp.; 4) *Campylobacter* sp.

Asociațiile au un anumit grad de selectivitate în sensul că legarea bacteriilor de rădăcini ar fi corelată cu unele interacțiuni specifice ca și în simbioza *Rhizobium*/plante leguminoase, însă natura lor este necunoscută.

Se consideră că rădăcinile unor ierburi furajere ar elimina substanțe capabile de adeziune selectivă, care, recunoscute de bacterii, ar favoriza adeziunea lor preferențială de perii radiculari. Datorită acestui mecanism, *Azotobacter paspali* formează simbioze asociative numai cu planta *Paspalum notatum*, varianta tetraploidă.

Alte asociații evidențiate sînt:

*Azospirillum* sp. cu *Digitaria decumbens*, *Panicum purpureum*, *Pennisetum* sp., *Setaria sphacelata* și *Zea mays* (porumb);

*Beijerinckia* sp. cu sfecla de zahăr (*Saccharum officinarum*);

*Campylobacter* cu *Spartina alternifolia*;

*Azotobacter* cu orzul (*Hordeum vulgare*).

În plus, la unele plante s-au înregistrat și alte asociații: *Bacillus macerans* și *B. polymyxa* la porumb, *Klebsiella pneumoniae* la *Poa pratensis* (plantă furajeră perenă).

Semnificația acestor asocieri este însă necunoscută.

**Natura asocierilor.** Intimitatea interacțiunilor dintre bacterii și plante nu este niciodată atît de evidentă ca în simbioza *Rhizobium*/leguminoase.

*Azotobacter paspali* pare să fie limitat ecologic la rizosfera unor varietăți de *P. notatum*, deoarece nu se găsește în solul din jur, la distanță de plantă, unde predomină *Beijerinckia* sp. sau *Derxia*. Bacteria colonizează ca un manșon rădăcinile plantei, fiind protejată de o teacă mucilaginoasă.

*Azospirillum* sp. a fost evidențiată în 50% din solurile din regiunile tropicale și numai în 10% din cele din regiunile temperate.

Frecvent întîlnite pe rădăcinile de grîu, porumb, sorg și graminee furajere tropicale, *A. lipoferum* formează asociații simbiotice cu rădăcinile de porumb, iar *A. brasilense* cu cele de grîu și orez (Berkum și Bohlool, 1980).

În aceste cazuri, bacteriile străpung epiderma radiculară și infectează celulele corticale superficiale ale rădăcinii, iar în cazurile în care infecția este mai extinsă se pot localiza în țesuturile corticale și vasculare. fără a forma structuri diferențiate. În acest fel, asociația inițial ectorizosferică se transformă în endorizosferică.

Frecvent, plantele prezintă anumite zone lacunare la nivelul rădăcinilor, în care se găsesc agregate de celule bacteriene ce primesc carbon de la plante și cărora le furnizează produși ai fixării azotului. Plantele infectate dezvoltă numeroase rădăcini laterale și peri radiculari, care ameliorează nutriția minerală prin favorizarea preluării nutrienților din mediu (Elmerich și colab., 1987). Acest proces este favorizat de producerea de către bacterii a unui fitohormon din categoria citokininelor (Okon și colab., 1985).

**Bazele moleculare și fiziologice** ale simbiozelor asociative sînt necunoscute.

O particularitate foarte caracteristică este aceea că toate plantele tropicale (cu excepția orezului), asociate cu o rată ridicată de fixare a azotului fac fotosinteză de tip $C_4$. Se apreciază că această particularitate stimulează formarea asociațiilor, deoarece, la aceste plante, produsul primar al fotosintezei este malatul, sursa optimă de C organic pentru microorganisme. Ca probă este și faptul că bacteriile lipsesc numai din rizosfera unui număr limitat de plante $C_4$, care, probabil, produc compuși antibacterieni. Aceste plante nu „risipesc" $CO_2$, utilizează eficient lumina intensă, beneficiază de temperatura ridicată a mediului ambiant și, spre deosebire de plantele $C_3$, exsudează cantități importante de C organic prin rădăcini, asigurînd un substrat nutritiv eficient bacteriilor heterotrofe (Sprent, Sutherland și de Farra, 1987). În general se consideră că fiziologia plantei este un factor cu importanță crucială pentru activitatea nitrogenazică și că numai acele plante care exsudează în cantități suficiente surse de C metabolizabili prin rădăcini au valoare agronomică.

Activitatea fixatoare de azot în simbiozele asociative este favorizată de tensiunea relativ redusă a oxigenului la nivelul rizosferei, de conținutul mare de mucilagiu radicular și de efectul protector al capsulei la unele bacterii.

**Eficiența simbiozelor asociative** nu a fost riguros determinată. Ea pare să fie maximă în regiunile tropicale, în timp ce în regiunile temperate semnificația este mult redusă. Cantitatea de $N_2$ fixat este corelată direct cu răspunsul bacteriilor la anumiți factori favorizanți din mediu. *A. paspali* ar fixa 90—117 kg N/ha/an, iar trestia de zahăr 40 kg N/ha/an.

Rolul simbiozelor asociative ar fi deosebit de important în regiunile tropicale, în care ele au menținut fertilitatea unor zone extinse în absența administrării îngrășămintelor azotate. În acest sens este de menționat menținerea de secole a fertilității solului din plantațiile de sfeclă de zahăr. La fel, în orezării și mai ales în unele bălți cu apă sărată, considerate ca unele dintre cele mai productive ecosisteme din natură, deși au un aport foarte limitat de N din exterior. În aceste bălți, un rol esențial pentru productivitate l-ar avea simbioza asociativă dintre *Campylobacter* și planta *Spartina alterniflora*.

Teoretic, eficiența limitată a simbiozelor asociative poate fi determinată de lipsa unor sisteme de transport menite să asigure aprovizionarea bacteriilor cu substrat energetic, pe care îl preiau din mediul periradicular. Se adaugă lipsa unui sistem eficient de export al produșilor fixării direct în plantă (ca în cazul simbiozei *Rhizobium*/leguminoase), precum și interacțiunile competitive cu microorganismele de mediu.

## SIMBIOZELE FOLIARE PRODUCĂTOARE DE NODOZITĂȚI

Descrise în anul 1902, de Zimmerman, simbiozele foliare sînt relativ puțin studiate. Sînt localizate la nivelul unor structuri de tipul nodozităților, derivate din unele formațiuni secretoare primitive active în timpul dezvoltării frunzelor.

Au fost descrise la o serie de plante din Africa și Australia tropicală ca; *Psychotria* și *Pavetta (Rubiaceae)*, la *Ardisia (Myrsinaceae* din America de Sud), precum și la unele specii de *Verbenaceae* și *Myoporaceae*.

Microorganismele fixatoare de $N_2$ sînt diferite în funcție de natura plantei-gazdă: *Klebsiella rubiacearum* la *Psychotria*, *Mycobacterium rubiacearum* la *Pavetta*, *Phylobacterium* sp. (*Bacillus folicola)* la *Ardisia* etc. Nodulii apar frecvent sub epidermul foliar ca niște cavități pline cu mucilagiu și cu celule bacteriene. Microsimbiontul este transmis vertical de la o generație la alta, prin intermediul semințelor infectate. Frunzele purtătoare de noduli participă la fertilizarea solului după ce cad, îmbogățind solul cu o litieră bogată în azot.

Semnificația simbiozelor foliare este controversată. Silver, Centifanto și Nicholas (1963) au demonstrat că plantele lipsite de simbioze foliare cresc foarte slab. Pe baza acestor date, confirmate de numeroși cercetători, se consideră că funcția esențială a bacteriilor din nodulii foliari ar fi cea de formare a unor factori de creștere (fitohormoni), în timp ce invadarea lor de către bacteriile fixatoare de N ar fi un fenomen secundar.

## ACTINORIZELE
## SIMBIOZA *FRANKIA* — ANGIOSPERME NELEGUMINOASE

**„Diversitatea filogenetică a speciilor-gazde de actinorize sugerează că procesele fiziologice care stau la baza nodulării sînt comune unui spectru larg de plante lemnoase. Dacă este așa, este posibil să se extindă spectrul speciilor-gazdă sensibile la *Frankia* prin tehnici convenționale și de genetică moleculară".**

A.M.BERRY

Prezența nodozităților radiculare la plantele neleguminoase a fost semnalată, încă din anul 1895, de Dinger, la *Alnus glutinosa*, la care a observat o corelație între numărul acestora și ritmul de creștere al plantei.

*Actinorizele* reprezintă asociații simbiotice fixatoare de azot la cel puțin 200 de specii de angiosperme, aparținînd la 15 genuri și respectiv la 7 familii. Ele includ plante lemnoase, caracteristice zonelor cu deficit de azot combinat, în care au un avantaj în competiția cu alte plante (tabelul nr. 23).

*Tabelul nr. 23*

**Exemple de plante-gazdă pentru actinorize**
(modificat după Berry, 1987)

| Familia | Genul | Situsuri ecologice |
|---|---|---|
| *Betulaceae* | *Alnus* | Soluri sărace, terenuri necultivate, nisipoase sau cu pietriș, cenuși vulcanice, zone postglaciale etc. |
| *Casuarinaceae* | *Casuarina* | Spectru foarte larg, dune de nisip, bălți sărate, păduri tropicale, zone de deșert. |
| *Coriariaceae* | *Coriaria* | Sol nisipos, pietriș, terenuri mlă știnoase, regiuni subalpine. |
| *Elaeagnaceae* | *Eleagnus* | Sol nisipos, zone perturbate, dune, sol steril. |
| | *Shepherdia* | Sol nisipos, zone perturbate. |
| | *Hippophae* | Dune de nisip, regiuni de coastă. |
| *Myricaceae* | *Myrica* | Terenuri umede, dune de nisip, reziduuri miniere. |
| | *Comptonia* | Zone cu nisip și pietriș. |
| *Rhamnaceae* | *Ceanothus* | Sol sărac de pădure, zone subalpine. |
| | *Discaria* | Sol cu pietriș, zone aride. |
| *Rosaceae* | *Cercocarpus* | Sol sărac uscat, de mare altitudine. |
| | *Dryas* | Sol nisipos, zone subarctice postglaciale. |
| | *Purshia* | Sol uscat, nisipos. |

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

## Simbiontul

Natura simbiontului (endofitului) angiospermelor este controversată. Marea majoritate a cercetătorilor îl consideră ca aparținînd unui gen nou — *Frankia* (familia *Frankiaceae*) — de actinomicete producătoare de nodozități la plante neleguminoase. *Frankia* este un locuitor normal al rizosferei, capabil să infecteze plantele.

Relația implică un grad important de specificitate. Tulpinile incompatibile produc noduli mici, care conțin puține celule infectate. Pînă în prezent au fost descrise zece specii de actinomicete specifice pentru plantele-gazdă respective: *F. alni (Alnus), F. brunchorsti (Myrica), F. casuarinae (Casuarina), F. ceanothi (Ceanothus), F. cercocarpi (Cercocarpus), F. coriariae (Coriaria), F. discardiae (Discaria), F. dryadis (Drias), F. elaeagni (Elaeagnus)* și *F. purshiae (Purshia)*.

Studiul interacțiunii actinomicetelor cu plantele-gazdă, efectuat, în principal, pe *Alnus glutinosa, Myrica gale* și *Casuarina cunninghamiana*, a evidențiat existența a trei stadii succesive de evoluție structurală și metabolică a actinomicetelor, reproduse parțial și *in vitro:*

**Faza de invazie** corespunde stadiului în care *Frankia* sp. prezintă o structură filamentoasă de tip hifal, ramificată și septată, cu organizare de tip procariot (citoplasma conține nucleosomi lipsiți de membrană nucleară). Hifele, cu diametrul de 0,5—1,5 μm, trec de la o celulă corticală la alta, perforînd pereții celulari și se ramifică profuz în celulele infectate. La cele mai multe specii sînt încapsulate într-un strat polizaharidic sintetizat de celula-gazdă.

După Berry (1987), stadiul hifal corespunde formei primare de existență, implicată în fenomenele de recunoaștere a plantei-gazdă și de infecție. Corespunde etapelor inițiale ale ciclului de viață al actinomicetelor din genul *Frankia*, atît ca simbionte, cît și *in vitro*. Stadiul hifal persistă în celulele corticale ale nodozității primare timp de două — trei săptămîni, formînd în celulele infectate o masă densă de filamente perinucleare.

**Formarea veziculelor** corespunde stadiului al doilea de dezvoltare a simbiozei. Este caracterizat prin apariția unor dilatări ale regiunilor terminale ale hifelor, care iau formă sferică la *Alnus, Hippophaë, Elaeagnus* și *Ceanothus* sau de măciucă (fig. 121) la *Myrica* și *Coriaria*.

Veziculele legate de hife sau de benzi de protoplasmă au diametrul de 3—5 μm și sînt situate inițial la periferia celulelor corticale pentru ca final să ocupe și zona centrală a acestora. Ele au o importanță deosebită pentru simbioză deoarece atît celulele infectate ale nodulilor radiculari, cît și *in vitro*, apariția lor este corelată cu debutul activității nitrogenazice ($N_2$-aza). Diferențierea lor structurală și metabolică este reglată de prezența sau de absența N din mediu. Astfel, adăugarea de mici cantități de N inhibă atît diferențierea veziculelor *in vitro*, cît și activitatea nitrogenazică. Transferul într-un mediu lipsit de N restabilește cele două proprietăți.

Veziculele dispun de mai multe mecanisme de protecție a nitrogenazei față de acțiunea inhibitoare a $O_2$. Cele mai importante sînt următoarele:

1) Prezența unui perete de înveliș gros, multilamelar, probabil glicolipidic, cu rol de barieră mecanică, funcțional analog celui al heterochiștilor de la cianobacterii *(Anabaena* ș.a.).

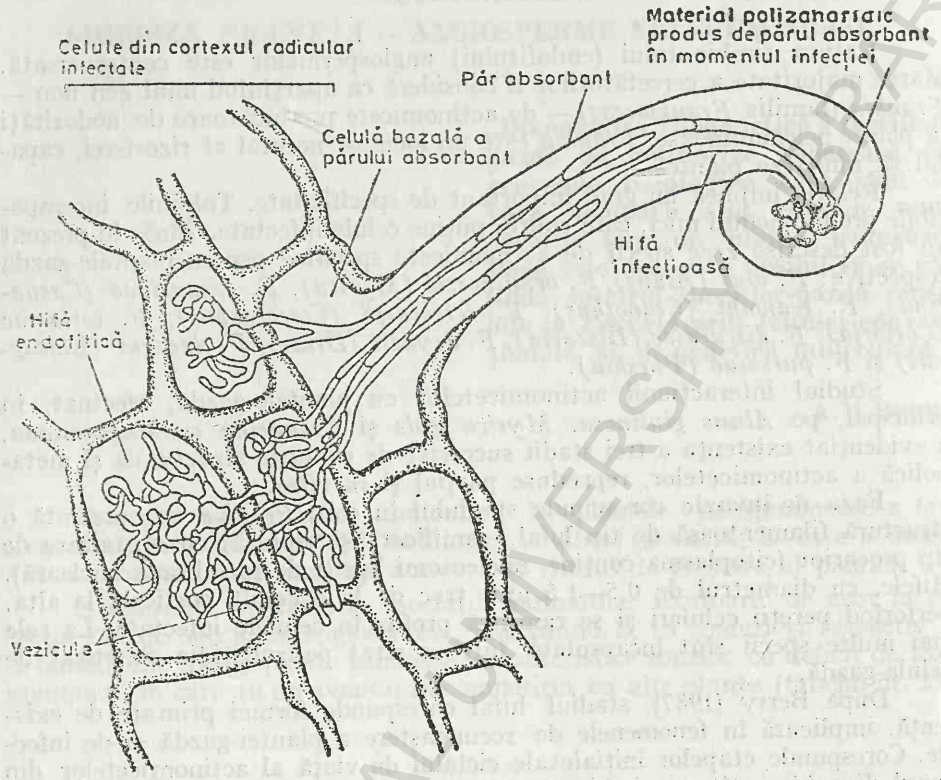



Fig. 121. — Actinorizele. Hifele de *Frankia* sp. invadează celulele cortexului radicular în care se ramifică și se încilcesc. Extremitățile lor se dilată progresiv și se diferențiază în vezicule, la nivelul cărora are loc fixarea azotului (după Dommergues și colab., 1985).

2) Existența unei activități respiratorii intraveziculare foarte intensă reprezintă un mecanism adițional sau alternativ pentru a crea un deficit local de $O_2$.

3) Împachetarea structurală strînsă a celulelor corticale infectate (hipertrofiate).

4) Prezența, cel puțin la unele sisteme studiate *(Casuarina, Myrica)*, a unor hemoglobine cu funcții analoge leghemoglobinei din sistemul *Rhizobium*/leguminoase.

**Formarea sporangiilor și a sporilor.** Faza ultimă corespunde apariției unor structuri descrise inițial sub denumirea de *granule* sau *bacteroizi* (denumire eronată prin analogie cu tipul de celule descris la leguminoase). În realitate, aceste structuri sînt echivalenți funcționali ai sporilor. Ei apar prin diferențierea veziculelor în sporangii și formarea sporilor prin creșterea unor septuri, care, fiind incomplete, compartimentau doar parțial veziculele.

Fenomenul este urmat de mărirea structurilor rezultate în așa fel încît, final, sporii maturi au formă sferică sau ovalară și Ø de 1,0—5 μm.

Ei au un conținut electronoopac, bogat în materiale de rezervă (poli-β-hidroxibutirat) și un perete celular gros, acoperit de o membrană triplu stratificată.

Prezenți în special în celulele vegetale care și-au încheiat ciclul de viață, sînt eliberați după moartea acestora. Atît în nodulii senescenți, cît și în sol, sporii reprezintă forme de latență. Deși germinează doar inconstant, ei reprezintă surse de obținere a unor izolate monocelulare.

Nu se cunosc factorii care asigură diferențierea lor *in vivo* sau *in vitro*.

### Infecția rădăcinilor

Modul de pătrundere a actinomicetelor în rădăcinile plantelor a fost studiat experimental prin depunerea unor suspensii bacteriene sau a nodozităților zdrobite pe sistemul radicular al unor plante tinere de *Alnus glutinosa* (Knowlton și colab., 1980). La unele plante ca, de exemplu, la *A. rubra*, nodozitățile se formează numai rar după infectarea cu o cultură pură de *Frankia*.

Nodularea eficientă este condiționată de prezența unor microorganisme asociate (actinomicete eficiente și ineficiente), care favorizează „pregătirea" perilor radiculari, deformarea lor și contactul intim cu bacteriile infecțioase.

Spre deosebire de sistemul *Rhizobium*/plante leguminoase, în acest caz, nu se cunosc mecanismele de recunoaștere *Frankia*/angiosperme. În mod cert, un rol important revine fenomenelor de adeziune: contactul inițial al hifelor multiple și ramificate cu situsurile de adeziune este favorizat de sinteza și secreția de către perii radiculari a unei matrice extracelulare de natură polizaharidică. Prezența bacteriilor în rizosferă stimulează secreția acestui mucilagiu de către rădăcinile plantelor. Acțiunea lui nu este specifică pentru *Frankia*, ci ar fi determinată, după Berry (1987), de structura de heteropolimer cu catene globulare turtite sau alungite ca niște filamente, care învelesc simbiontul într-o matrice și-l interconectează cu suprafața rădăcinilor.

Infecția propriu-zisă este precedată de o deformare extensivă și frecvent de o ramificare a perilor radiculari (fig. 122), evidentă după 1—2 zile de la depunerea culturii bacteriene. Ea este determinată de alungirea celulei părului radicular, care este intens vacuolizată în regiunea distală, în timp ce baza părului absorbant rămîne densă, citoplasmatică. Nu se cunoaște natura stimulului care induce deformarea.

Invazia simbiontului se realizează prin degradarea peretelui celular al părului radicular, după care membrana citoplasmatică a acestuia se invaginează ca un deget de mănușă. În felul acesta, hifa-endosimbiontului invadant înaintează în celula acoperită de o structură membranară derivată din membrana citoplasmatică invaginată. Concomitent, celula-gazdă sinteti-

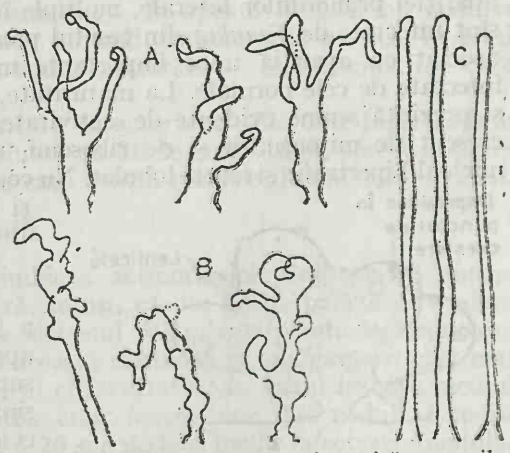



Fig. 122. — Reprezentarea schematică a perilor radiculari la *Myrica gale* (A) (× 300), la *Alnus glutinosa* (B) (× 600), la trei săptămîni de la inoculare, și la *A. glutinosa* (C) (× 600), neinoculat (după Bond, 1963).

zează, o substanță mucopolizaharidică, probabil de natură pectică care învelește hifele intracelulare ca un strat capsular, pe toată durata existenței lor. După Newcombe și colab. (1974), o parte importantă din activitățile celulei și din energia consumată sînt folosite pentru acest proces de încapsulare a hifelor.

Infecția părului radicular modifică dinamica sintezei peretelui celular în sensul creșterii acestuia. Straturile peretelui intern prezintă proliferări neregulate, în timp ce, în unele regiuni, se formează un perete secundar bine organizat, multilamelar. Materialul din care este format noul perete este numit caloză.

**Formarea prenodulului** este rezultatul a trei procese succesive:

1) activitatea mitotică localizată în cortexul rădăcinii;
2) proliferarea și hipertrofia celulară;
3) diferențierea celulelor-gazdă infectate.

Pe măsură ce „cordonul infecțios" traversează părul radicular, celulele corticale ale rădăcinii sînt stimulate să se dividă. Diviziunile celulare sînt localizate inițial la baza perilor radiculari deformați și preced accesul actinomicetelor în țesutul cortical. Infecția cortexului se extinde, afectînd celulele recent divizate, care, în același timp, se hipertrofiază.

*Stadiul de prenodul* sau de *situs de invazie* (Callahan și Torrey, 1977) corespunde apariției unei mici nodozități primare, ca o proeminență radiculară, într-un sector localizat pe axul rădăcinii originare.

Concomitent, filamentele hifale se ramifică, trecînd dintr-o celulă radiculară în alta. Procesul este facilitat de faptul că *Frankia* produce enzime hidrolitice ale peretelui celular, dezorganizînd structura acestuia în zona infectată, favorizînd difuzia infecției. În felul acesta este îndepărtată bariera mecanică pentru invazie. Fragmentele de perete celular eliberate prin degradarea acestuia pot acționa ca factori stimulatori, activînd sinteza de perete celular nou, esențială pentru proliferarea celulară. De asemenea, ele ar putea acționa ca molecule informaționale cu rol în recunoașterea situsurilor de adeziune.

Invazia celulelor corticale ale rădăcinii este asociată cu stimularea apariției primordiilor laterale, multiple în zona infectată, care, la rîndul lor, sînt infectate de *Frankia* din țesutul prenodular (Berry, 1987). Procesul este asociat cu apariția unor importante modificări ce deosebesc net celulele infectate de cele normale. La maturitate, celulele infectate sînt hipertrofiate și prezintă semne evidente de activitate celulară intensă: conțin un număr crescut de mitocondrii și de ribosomi, reticulul endoplasmatic este mărit, nucleul hipertrofic și foarte lobulat. Nu conțin substanțe de rezervă (amidon) și au un metabolism energetic crescut.

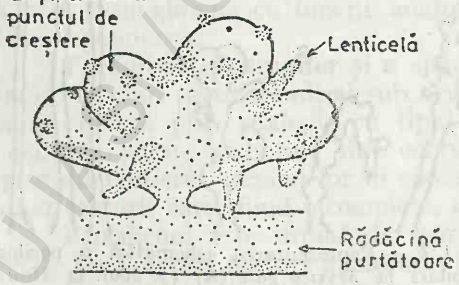



Fig. 123.—Reprezentarea schematică a nodozităților la *Alnus glutinosa* în culturi hidroponice (× 15) (după Bond, 1963).

### Apariția nodozităților

Evoluția procesului infecțios și a fenomenelor induse de el determină apariția unor nodozități laterale pe suprafața rădăcinilor. Formațiunile simple originare au o asemănare externă evidentă cu nodozitățile de la leguminoase. După 10—15 zile, pe suprafața nodulului simplu originar apar lobi noi, situați în regiunea apicală (fig. 123). Repetarea acestui proces de

ramificare și producere anuală de noi noduli fac ca, datorită caracterului lor peren, după o perioadă de timp, pe suprafața rădăcinilor apar ca o grupare („cluster") compactă neregulată de noduli numeroși, cu aspect coraloid (fig. 124), numit rhizothamnion.

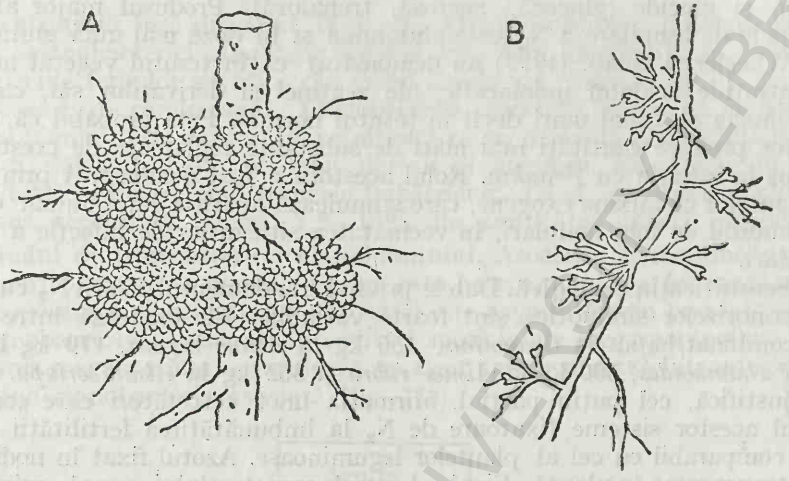



Fig. 124. — Reprezentarea schematică a grupurilor de nodozități la *Casuarina sumatrana* (A) și la *Rubus elipticus* (B) (după Soemartano, 1976).

Global, ei pot avea diametrul de la cîțiva milimetri la 10—15 cm și sînt alcătuiți dintr-un număr mare de nodozități individuale, asemănătoare celor de la leguminoase.

Nodulii au o culoare variabilă (galben, brun, portocaliu) în funcție de natura pigmenților predominanți. Nodozitățile tinere de la *Alnus*, *Myrica* și *Casuarina* sînt colorate în roșu intens, datorită unor pigmenți antocianici. La unele specii *(Myrica gale* și *Casuarina)*, la apexul fiecărui lob nodular apar rădăcini normale albe, dirijate în mod caracteristic în sus. În felul acesta, fiecare cluster de noduli apare „îmbrăcat" în rădăcini fine care cresc în sus.

Celulele nodulului sînt modificate caracteristic. Ele sînt hipertrofiate și la un moment dat aparent „umplute" cu hifele endofitului, spre deosebire de celulele normale, mult mai mici, care conțin rezerve de amidon și tanin.

### Relația plantă-gazdă — endofit

Cunoștințele referitoare la simbioza actinorizelor sînt relativ puține și adesea contradictorii. Se consideră, totuși, că din multe puncte de vedere ar fi comparabilă cu relația dintre sistemul *Rhizobium*/plante leguminoase.

Deși Quispel (1960) consideră această simbioză ca obligatorie, cele mai multe date pledează pentru caracterul ei facultativ: în cazul în care mediul conține suficient N combinat, plantele cresc foarte bine fără noduli. Experimental s-a demonstrat că prezența a 20 mg N/l în mediu afectează nodularea la *Hippophaë*, iar la *Alnus* chiar concentrația de 10 mg N/l.

La rîndul lor, actinomicetele pot fi cultivate *in vitro* pe medii adecvate. Ele produc colonii alcătuite dintr-o împletitură de filamente, din care se pot dezvolta stadiile de vezicule, de sporangii și de spori. Așa cum s-a

demonstrat, sporii (uneori împreună cu hifele) persistă în sol după moartea nodulilor și/sau plantei-gazdă. Ei reprezintă, totodată, și forme de dispersare în natură prin intermediul curenților de aer.

Simbiontul utilizează diferiți acizi organici (propionic, succinic, malic), precum și glucide (glucoză, sucroză, trehaloză). Produsul major al căilor principale de asimilare a $N_2$ este glutamina și în doze mai mici glutamatul.

Wheeler și colab. (1977) au demonstrat că în țesutul vegetal nodulat, concentrațiile acidului indolacetic, ale zeatinei și derivaților săi, ca și ale giberelinelor sînt mai mari decît în țesutul normal. Este probabil că țesutul gazdelor produce cantități mai mari de substanțe reglatoare de creștere ca răspuns la infecția cu *Frankia*. Rolul acestora a fost demonstrat prin tratarea plantelor cu auxine exogene, care stimulează apariția unui număr crescut de primordii de lobi nodulari, în vecinătatea situsurilor de infecție a perilor radiculari.

**Semnificația ecologică.** Datele privind randamentul fixării $N_2$ cu ajutorul actinorizelor simbiotice sînt foarte variabile. Ele oscilează între 60 kg azot combinat/ha/an la *Ceanothus*, 150 kg la *Alnus rugosa*, 179 kg la *Hippophaë rhamnoides*, 300 kg la *Alnus rubra* și 362 kg la *Alnus crispa*. Aceste date justifică, cel puțin parțial, afirmația unor cercetători care consideră aportul acestor sisteme fixatoare de $N_2$ la îmbunătățirea fertilității solului drept comparabil cu cel al plantelor leguminoase. Azotul fixat în nodul este rapid transportat în plantă. Final, el este înapoiat solului, anual, prin litiera de frunze sau prin intermediul nodulilor și al rădăcinilor care mor.

Importanța deosebită a actinorizelor decurge, în primul rînd, din faptul că cele mai multe plante-gazdă sînt specii „pionier". Ele populează terenuri cu deficit foarte important de azot, favorizînd instalarea altor specii vegetale, stînd la baza apariției unor asociații vegetale în zone aride și în diferite condiții extreme (terenuri mlăștinoase, soluri sărace, dune de nisip, pietriș, reziduuri miniere, cenuși vulcanice, regiuni subalpine sau arctice postglaciații, bălți sărate, soluri de pădure tropicală, zone de deșert etc.).

În al doilea rînd, acțiunea actinorizelor este importantă prin larga răspîndire a plantelor cu care intră în simbioză, prezente atît în regiunile temperate, cît și în cele arctice, subalpine, de șes, subtropicale și tropicale.

Este probabil că spectrul de gazde este mai mare decît cel cunoscut în prezent. În plus, natura perenă a plantelor amplifică semnificația ecologică a simbiozei, deoarece actinorizele furnizează o contribuție pe termen lung la îmbogățirea solului în $N_2$ combinat. În felul acesta, ele pot avea un rol deosebit de important în ameliorarea unor ecosisteme neamenajate de om.

**Aspecte evolutive.** Probabil că simbioza *Frankia*/angiosperme neleguminoase a apărut într-o perioadă geologică timpurie, cînd acestea erau reprezentate doar de plantele lemnoase și condițiile formării de simbioze erau foarte favorabile. Simbioza nodulară a debutat, probabil, ca o asociere întîmplătoare între rădăcinile plantelor și un microorganism fixator de $N_2$ liber, avînd oarecare tendință de comportament parazitar. Acesta a dispus de posibilitatea de a-și cupla metabolismul cu cel al plantei pentru a realiza împreună un sistem fixator de $N_2$. Perioada de tranziție care a urmat, caracterizată prin apariția de noi angiosperme, a fost, în același timp, o perioadă în care deficitul de azot în sol s-a accentuat progresiv. Această situație a determinat o creștere progresivă a presiunii selecției în favoarea stabilirii de noi asociații simbiotice fixatoare de azot.

## CIANOBACTERII FIXATOARE DE AZOT

### Simbioza *Azolla* — *Anabaena azollae*

Evidențiată încă din anul 1873, de către Strasburger, prezența heterochiștilor cianobacteriei *Anabaena azollae* este larg răspîndită în natură la toate speciile ferigilor acvatice din genul *Azolla (A. filiculoides, A. pinnata, A. mexicana, A. caroliniana)*. Cianobacteria, asociată inițial cu meristemul apical al plantei, este capturată pe măsură ce se dezvoltă primordiile frunzelor în cavitățile formate pe lobii dorsali ai acestora. Ea rămîne în acest microhabitat și moare cînd frunzele îmbătrînesc. La *A. caroliniana*, clorofila bacteriană reprezintă numai 7,5—15% din cantitatea totală a asociației.

**Modul de transmitere a cianobiontului.** Asociația se menține în cursul reproducerii sexuate a plantei. Feriga este heterosporală și formează mega- și microsporangii. Continuitatea asociației este asigurată prin prezența akineților cianobacterieni inclavați în cavități speciale ale megasporangilor. După fertilizarea megasporului se formează un zigot care evoluează într-un sporofit, ce conține cianobacteria asociată (fig. 125).

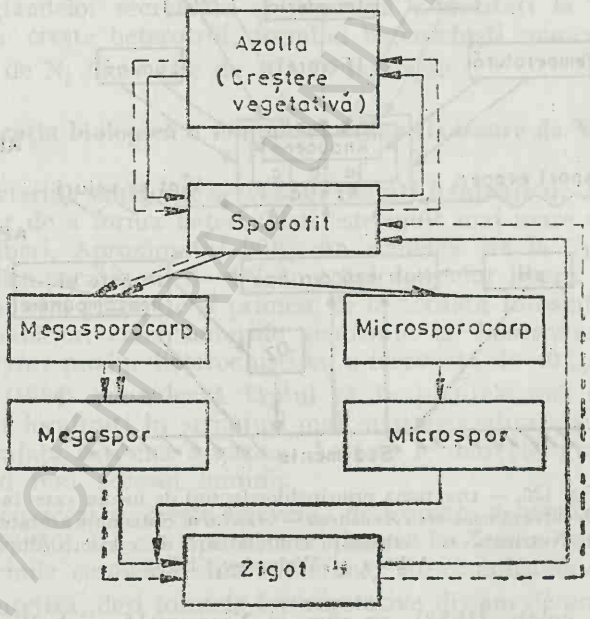



Fig. 125. — Ciclul de viață la *Azolla filiculoides* (———), evidențiind modul de asigurare a continuității asocierii cu *Anabaena azollae* (— — —) (după Ashton și Walmsley, 1976).

**Semnificația asociației** este cea de relație mutuală, în care fiecare partener își exercită funcțiile specifice.

Cianobiontul, care obține protecție fizică, fixează $N_2$ atmosferic în cantități care satisfac atît nevoile proprii, cît și pe cele ale gazdei, căreia îi cedează $NH_4$.

La rîndul său, planta, a cărei creștere este foarte mult stimulată de prezența cianobacteriilor, le furnizează acestora o sursă de C, probabil, sub formă de sucroză. Feriga asimilează azotul de la simbiontul natural, mult mai eficient decît din mediu.

Ambii parteneri fac fotosinteză de tip plante superioare, ceea ce le permite să fixeze $CO_2$ pe calea ciclului lui Calvin (Ray și colab., 1979). Asocierea este foarte strînsă și, probabil, de lungă durată în trecut. Cele două organisme își influențează reciproc nu numai creșterea, ci și activitatea metabolică.

Ca o consecință a habitatului, caracteristicile fixării $N_2$ de către *A. azollae* simbiotică sînt diferite de cele realizate în stare liberă (între altele, fixarea nu este supresată de prezența N combinat în mediu).

Asociația este influențată de o serie de factori din mediu (pH, temperatură, oxigen, $CO_2$, lumină etc.) (fig. 126).

Randamentul fixării este apreciat la ~ 120 kg N/ha/an, iar în condiții favorabile chiar la 350—670 kg N/ha/an (Milbank, 1974). Eliberarea N fixat se realizează prin mineralizare după moartea frunzelor.

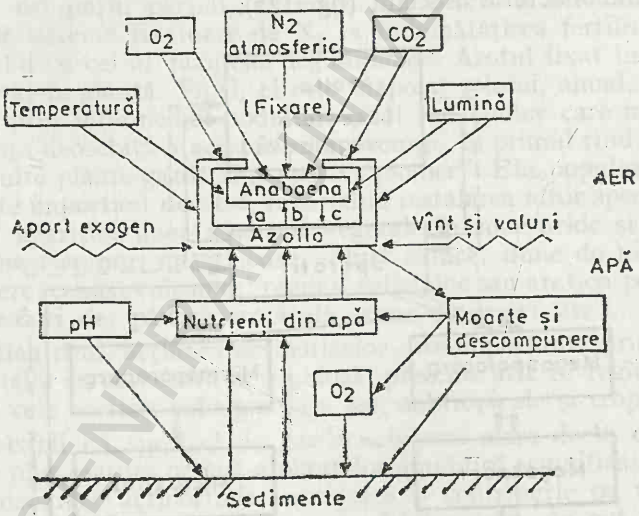



Fig. 126. — Diagrama principalilor factori de mediu care influențează asocierea *Anabaena — Azolla*. a. Substanțe azotate. b. Nutrienți. c. Substanțe stimulatoare de creștere (după Ashton și Walmsley, 1976).

Caiola și colab. (1988), precum și Nierzwicki și Aulfinger (1990) au semnalat prezența în cavitățile frunzei la *Azolla* a unor simbionți eubacterieni bacilari, cocoizi sau helicali descriși ca *Alcaligenes* sp., *Caulobacter fusiformis*, *Pseudomonas* sp. și mai recent ca *Arthrobacter* sp. Eubacteriile sînt localizate în cavități ale frunzelor lipsite de cianobionți. Ele sînt în număr de ~ 300 în cavitățile frunzelor tinere și de 10—16 000 în cele bătrîne. Global, numărul eubacteriilor este mai mic în plantele lipsite de cianobionți, probabil datorită reducerii cantităților de nutrienți.

*Semnificația biologică* a prezenței eubacteriilor nu este încă cunoscută.

## Simbioza cianobacterii — gimnosperme

Această simbioză este limitată la aproximativ 100 de specii de *Cycadales*.

Plantele de *Cycas* formează, pe lîngă rădăcinile normale, rădăcini laterale „coraloide", ageotrope, care apar ca niște excrescențe dilatate, situate la suprafața solului sau aproape de acesta, asemănătoare nodozităților. Cianobacteriile endosimbionte *(Nostoc* sp. și *Anabaena* sp.) sînt localizate intracelular, în rădăcinile coraloide, la nivelul așa-numitelor *zone algale*, din cortexul extern și intern. Regiunile respective sînt mărite ca volum și colorate în verde. La *Macrozamia* și *Encephalartos*, cianobacteriile sînt localizate într-un spațiu aerian distinct, la nivelul cortexului nodozităților.

Aportul de azot fixat în această simbioză este estimat la circa 19 kg/ /ha/an.

## Simbioza cianobacterii — angiosperme

Această simbioză este limitată la aproximativ 25 de specii de *Gunnera* asociate cu cianobacteriile fixatoare de $N_2$ din genul *Nostoc*. Acestea pătrund prin pereții glandelor secretoare și formează nodozități la baza frunzelor, în care *Nostoc* crește heterotrof, formînd heterochiști numeroși.

Aportul de $N_2$ fixat este de 10—70 kg/ha/an.

### Semnificația biologică a cianobacteriilor fixatoare de $N_2$

Cianobacteriile simbionte servesc ca unități fixatoare de $N_2$. Ca dovadă, capacitatea lor de a forma heterochiști este mult mai mare decît a echivalenților lor liberi. Aproximativ 90% din cianelele de la *Cycas* sp. produc heterochiști, comparativ cu 3—4% în cazul formelor libere. Ele furnizează gazdei $NH_4^+$ și acid glutamic și primesc de la aceasta fotosintat (C organic). În mod asemănător, cianobacteriile simbionte la *Phaeoceros (Anthoceros) levis (Bryophyta)* produc heterochiști cu o frecvență de 40%.

Reisser (1984) semnalează faptul că în plantele mai evoluate, endosimbionții sînt localizați în structuri mult mai specializate și situate la distanță de suprafața extremă a gazdei. Aceasta le mărește gradul de protecție, diminuînd însă accesul luminii.

Paralel cu aceasta, crește frecvența de formare a heterochiștilor (Bergman și colab., 1986). Un caz tipic este cel descris la *Zamia riedlii (Cycadales)* la care rădăcinile coraloide sînt subterane, iar cianobacteriile intracelulare nu pot fotosintetiza, deși formele lor vegetative dispun de ansamblul aparatului celular necesar pentru aceasta (Lindblad și colab., 1985).

Situația este asemănătoare, cu anumite nuanțe de ordin cantitativ, la *Gunnera* sp.

În aceste cazuri, capacitatea fotosintetizantă a cianobacteriilor este extrem de redusă sau chiar absentă. Ele trăiesc heterotrof și fixează azotul, cedînd plantei-gazdă pînă la 90% din cantitatea de N fixată (Meeks și colab., 1985).

Fixarea azotului este favorizată de numărul mare de heterochiști și de faptul că simbiontul a încetat să crească, nevoia lui de fotosintat limitîndu-se la necesitățile funcționării complexului nitrogenazic.

**Perspective de aplicare.** Cunoașterea aprofundată a biologiei cianelelor fixatoare de $N_2$ a dus la ideea creării unor sisteme artificiale de sincianoze, prin tehnici de inginerie genetică, probabil, în special, prin fuziune de protoplaști. Obținerea unor simbioze cianobacteriene la porumb, la tutun sau la alte plante de cultură ar permite crearea unor plante „pionier", menite să colonizeze mediile naturale deficitare în azot.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# MICORIZELE

„Micorizele, aceste asociații atît de puțin iubite de microbiologi..."

D. BERTRAND

Micorizele reprezintă rezultatul unei asociații simbiotice în cursul căreia radicelele celor mai multe plante sînt colonizate de fungi specifici, în cursul perioadelor lor de creștere. Interrelația implică:

1) asocierea relativ constantă a celor doi parteneri;

2) infecția „normală" a plantelor de către fungi, în absența simptomelor patologice;

3) invadarea exclusivă a cortexului radicular, cu menținerea sterilității meristemului apical și a cilindrului vascular;

4) absența leziunilor și menținerea proprietăților biologice normale ale celulelor radiculare;

5) dezvoltarea frecvent (dacă nu invariabil) mărită a plantelor purtătoare de micorize, comparativ cu cele lipsite de acestea.

Micorizele apar ca un „organ", morfologic distinct, caracteristic gazdei și fungilor respectivi aflați într-o relație simbiotică sau, după unii autori, de parazitism reciproc, fiziologic, bine echilibrat.

**Răspîndirea în natură** este foarte largă. După Meyer (1974), peste 80% din taxonii studiați sînt purtători de micorize, prezența unor plante neinfectate reprezentînd mai degrabă excepții decît regula.

Micorizele lipsesc la: *Centrospermae, Plumbaginales, Cruciferae, Farinosae, Cyperales, Caryophylaceae,* care, probabil, produc unele substanțe antifungice. Lipsesc, de asemenea, la: *Filicales,* la plantele acvatice și la cele care trăiesc pe soluri mlăștinoase *(Droseraceae, Oenotheraceae, Halorrhagaceae* etc.).

**Clasificarea micorizelor.** Deși contestată de unii cercetători, datorită unor ambiguități, clasificarea cel mai frecvent utilizată în practică se bazează pe raportul dintre hifele fungice și celulele corticale ale rădăcinii. Pe acest criteriu, micorizele aparțin următoarelor categorii (tabelul nr. 24):

1) *Ectomicorize* (micorizele ectotrofe), în care fungii produc infecții hifale intercelulare;

2) *Endomicorize* (micorizele endotrofe) cu localizarea intracelulară a hifelor (fig. 127);

3) *Ectoendomicorize,* incluzînd ambele tipuri de infecție;

4) *Micorize peritrofe.*

Se consideră că, în general, caracteristicile genetice ale plantelor predetermină nu numai natura grupului de fungi care pot infecta rădăcinile, ci și tipul de micorize ce pot fi stabilite la specia respectivă (Smith, 1980).

*Tabelul nr. 24*

**Principalele caracteristici ale diferitelor tipuri de micorize**

(după Smith, 1980)

| Denumirea micorizelor | Particularitățile tipice | Simbionții | | Modul de nutriție |
|---|---|---|---|---|
| | | Plantele superioare | Fungii | |
| ECTOTROFE * (Ectomicorize) | Manta fungică<br>Rețea Hartig<br>Absența hifelor intracelulare și a lizei | Autotrofe<br>Arbori (*Pinus, Fagus, Quercus, Eucalyptus* etc.) | Nutriție specializată<br>*Basidiomycetes, Endogone* și *Ascomyceles.* | Biotrofie ** |
| VEZICULO-ARBUSCULARE * (Endotrofe, endomicorize) | Absența mantalei fungice<br>Vezicule intracelulare și arbusculi.<br>Liză. | Autotrofe. În special ierboase. Prezente la cele mai multe familii.<br>Absente sau rare la *Juncaceae* și *Cruciferae* | Nutriție specializată „Necultivabili"<br>*Endogonaceae* (*Glomus, Acaulospora, Gigaspora*) | Biotrofie** |
| ERICOIDE * (*Ericacee*, endotrofe, endomicorize) | Manta rară<br>Spirale încolăcite intracelulare<br>Liză | Arbuști<br>*Ericaceae, Empetraceae, Epacridaceae* | Cresc lent. *Pezizella ericae, Clararia* sp.<br>Ecologie necunoscută. | Biotrofie**<br>Necrotrofie*** |
| ARBUTOIDE * (*Ericaceae*, ectoendotrofe, ectoendomicorize) | Manta fungică<br>Absența rețelei Hartig<br>Haustori intracelulari<br>Liză | Autotrofe<br>*Arbutus, Arctostaphylos* | a) Fungi similari celor de la ectomicorize.<br>b) Epiparazitism pe gazde autotrofe ale micorizelor via fungi similari de la ectomicorize.<br>c) *Armillaria* saprofit din sol sau parazit necrotrof | Necercetat<br>Mod de nutriție nedeterminat. |
| *Orchidacee* * (endotrofe) | Hife externe<br>Spirale încolăcite intracelulare<br>Liză | Autotrofe și heterotrofe | *Rhizoctonia* cu capacități bune de competitivitate saprofită sau epiparazite (ca la b) | Angiosperme heterotrofe parazite pe fungi<br>Mod de nutriție nerezolvat |

* Denumire recomandată.

** Nutrienți din celule vii.

*** Implică utilizarea conținutului celulelor moarte de către microorganismele heterotrofe. Moartea celulară poate fi determinată de perturbarea profundă, structurală și/sau metabolică, a unor enzime (celulaze hemicelulaze, pectinaze, ligninoxidaze etc.).

Micorizele nu sînt structuri statice. Ele prezintă o secvență de dezvoltare, de maturare și de senescență, în care relația dintre simbionți se modifică. Diferitele segmente ale sistemului radicular au relații diferite cu fungii în funcție de poziția rădăcinilor în ierarhia ordinelor de ramificație.

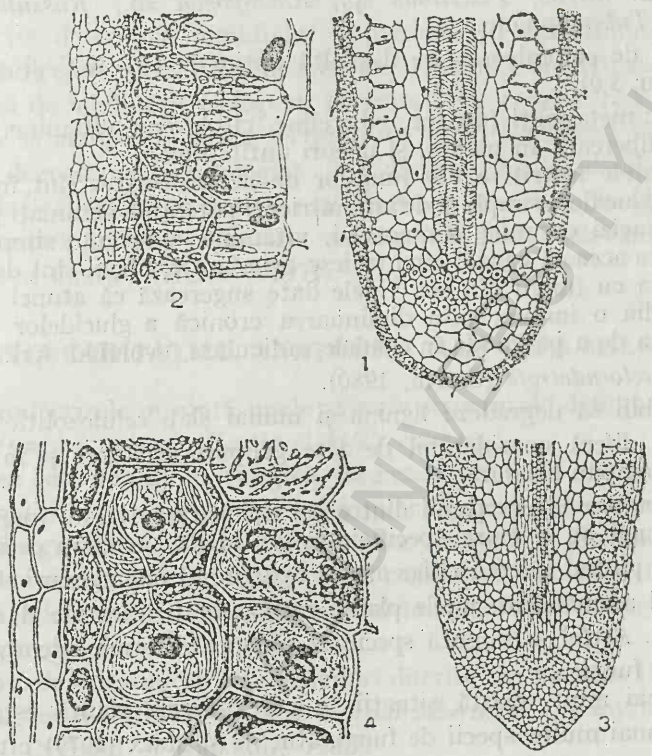



Fig. 127. — Micorizele. Secțiune prin rădăcina de *Pinus silvestris* cu micorize ectotrofe **(1)** și aspectul unei regiuni examinată după mărire **(2)**. Micorize endotrofe la *Neottia* sp. **(3)** și aspectul unei secțiuni longitudinale, după mărire adecvată **(4)**. Unele celule conțin hife fungice de micorize funcționale, în timp ce în altele, acestea sînt în stadii diferite de digerare (după Magnus, 1941).

## ECTOMICORIZELE

Sînt asociații simbiotice rezultate din interacțiunea complexă a miceliilor fungice cu rădăcinile plantelor pentru a forma o unitate morfologică integrată în care fungii rămîn permanent localizați extra- și intercelular.

Răspîndirea ectomicorizelor este foarte largă. Plantele-gazdă sînt, în special, arborii din pădure, în soluri brune sau podzolizate. Sînt mai rare la arborii izolați situați în solurile agricole.

Au fost descrise la: *Pinaceae, Fagales, Juglandales, Dipterocarpaceae, Myrtaceae, Caesalpinoideae, Tiliaceae* etc.

Fungii de ectomicorize aparțin claselor: *Basidiomycetes* evoluate (ciuperci cu pălărie), *Ascomycetes* (trufe) și *Phycomycetes*. Speciile cele mai frecvent întîlnite sînt: *Amanita muscaria, A. citrina, Boletus edulis, Lactarius deliciosus, L. helvus, Pisolithus* sp., *Rhizopogon* sp., *Russula* sp., *Suilus granulatus, Tuber* sp. etc.

Fungii de ectomicorize se dezvoltă optim la 15—30°C și pH 4,0—6,0 (uneori chiar 3,0).

Produc metaboliți (auxine, gibereline, citokinine, vitamine, acizi grași pe care îi eliberează în plante, și uneori antibiotice.

**Exigențele nutritive ale fungilor de ectomicorize.** Sînt, în general, dependenți de glucidele simple și de alți nutrienți potențiali eliminați pe suprafața rădăcinilor (acizi organici, aminoacizi, vitamine, substanțe stimulatoare ale creșterii). Din această cauză, cînd trăiesc asimbiotic, liberi, sînt dezavantajați în competiția cu fungii din sol. Unele date sugerează că atunci cînd condițiile de mediu o impun, prin diminuarea cronică a glucidelor din sol pot avea tendința de a pătrunde în celulele radiculare, evoluînd spre producerea de *micorize ectoendotrofe* (Smith, 1980).

Incapabili să degradeze lignina și numai slab celulozolitici, fungii de ectomicorize diferă considerabil de alte grupuri ecologice și în special de cei care descompun litiera.

*Specificitatea* interacțiunii dintre cei doi parteneri este foarte diferită. Unii fungi au o mare specificitate de gazdă, în timp ce alții au un spectru larg, putînd infecta chiar arbori aparținînd unor genuri diferite.

În mod asemănător, unele plante-gazdă pot fi infectate de mai mulți fungi diferiți. Astfel, o singură specie de pin poate forma micorize cu peste 40 de specii fungice.

Ceva mai mult, există situații în care aceeași plantă este infectată simultan de mai multe specii de fungi. Ruehle și Marx (1979) citează cazul unor ectomicorize de la care a izolat trei specii diferite de fungi. Uneori, un mic segment individual al unei rădăcini laterale poate fi infectat de mai multe specii de fungi.

## MODUL DE FORMARE A ECTOMICORIZELOR

Hifele fungice infectante provenite din sporii germinați sau din alte propagule sînt stimulate să crească rapid în rizosferă sub acțiunea substanțelor din exsudatul radicular (în mod particular a factorului M). Ele cresc și înconjură rădăcina. Inhibitorii din exsudat îi împiedică să inițieze o stare patologică.

Fungii pătrund la nivelul rădăcinilor tinere, sensibile la atac, deoarece straturile de cutină și barierele fizice corespunzătoare se formează numai în rădăcinile mai vechi (Meyer, 1974). După Harley (1984), pătrunderea s-ar realiza, în special, într-o regiune situată înapoia punctului de creștere a

rădăcinii, descrisă la ectomicorize de Marks și Foster (1973) sub denumirea de *zona de infecție a micorizelor*. În mod normal, fungii de micorize nu invadează meristemul, datorită „imunității" lui și, mai ales, faptului că este constant reînnoit, avînd o poziție temporară, prin deplasarea sa permanentă în substrat.

Infecția determină modificări importante în dimensiunile relative ale celulelor radiculare și în diferențierea lor. Distanța de pătrundere a hifelor este reglată de inhibitorii endogeni. Pe măsură ce celulele rădăcinii infectate se divid și se alungesc, auxina secretată de fungi determină modificări marcante în dezvoltarea morfologică a rădăcinii. Perii radiculari nu se mai dezvoltă, iar cei infectați, rămași mai scurți, se ramifică. La pin, ramificarea este dihotomică, în timp ce la alte specii este regulată (cu ramificații de fiecare parte a axului) (Harley, 1971).

## PARTICULARITĂȚILE ANATOMICE ALE ECTOMICORIZELOR

Ectomicorizele prezintă unele aspecte structurale definitorii care includ *mantaua fungică*, *rețeaua Hartig* și *hifele externe*.

**Teaca sau mantaua fungică** formează un țesut fungic gros, pseudoparenchimatos, care acoperă radicelele plantei-gazdă. Poate reprezenta pînă la 40% din greutatea uscată a rădăcinilor respective (Smith, 1980). Ea nu este o rețea simplă de hife, ci un sistem complicat, ramificat, întrețesut, dezvoltat din hifele care pătrund între celulele epidermice și, uneori, chiar între celulele cortexului radicular (fig. 128).

A fost descrisă inițial sub denumiri diferite ca: *palmetti* (Mangin, 1910), *lamele fungice* (Strulu, 1976), *sistem hifal labirintic* („Labyrinthyne hyphal system"), (Nylund și Unistam, 1982).

Rezultat al unei dezvoltări considerabile a hifelor fungice, teaca asigură o mare suprafață de contact între cei doi simbionți, fără ca hifele să pătrundă în celulele vii active. Ele secretă enzime pectinolitice cu ajutorul cărora pot pătrunde între celulele cortexului.

**Hifele externe.** Teaca fungică prezintă conexiuni cu solul, din care se dezvoltă o rețea luxuriantă de hife ramificate sau lanțuri hifale numite *rizomorfe*. Frecvent, acestea cresc spre suprafața solului, pentru ca în condiții favorabile să se diferențieze, formînd corpuri sporifere (engl. „Fruiting body") epigee sau hipogee, a căror nutriție este asigurată de planta-gazdă. Bjorkman (1949) a demonstrat necesitatea absolută a conexiunii lor cu arborii: apariția corpurilor sporifere este împiedicată dacă se secționează rizomorfele cu ajutorul unor plăci metalice introduse în pămînt, separîndu-le astfel de rădăcinile arborilor-gazdă. Aceasta demonstrează că majoritatea ciupercilor comestibile (inclusiv trufele), prezente în apropierea copacilor, sînt corpuri sporifere ale fungilor de ectomicorize și nu saprofiți de materie organică

în descompunere, cum s-a considerat inițial. Ei sînt legați de sistemele hifale care se ramifică în sol și implicit de rădăcinile vii ale plantelor sănătoase (Hacskaylo, 1972). Pătrunderea hifelor în rădăcinile arborilor este o precondiție pentru formarea acestor sporofori în condiții naturale, ceea ce explică apropierea anumitor fungi de speciile specifice de arbori. Corpurile

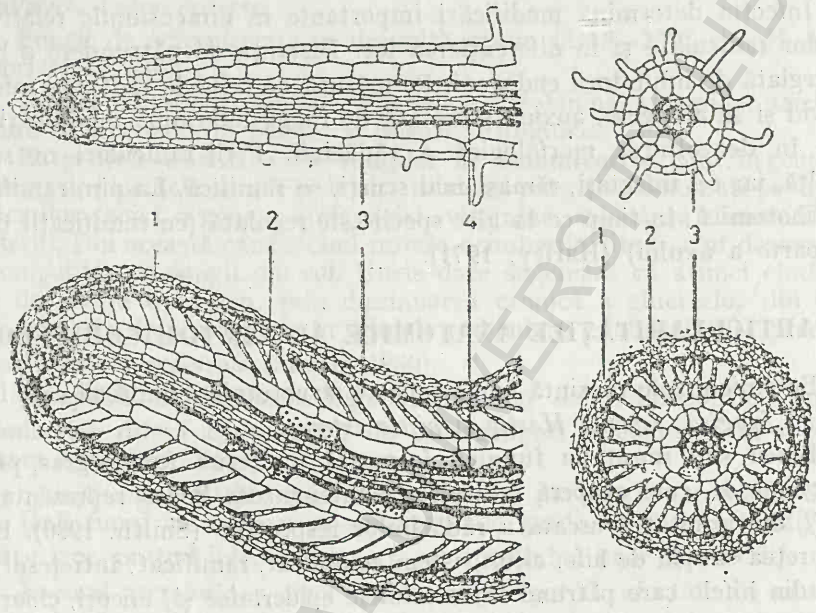



Fig. 128. — Reprezentarea schematică a aspectului unor secțiuni longitudinale și transversale prin rădăcini cu micorize (jos) și fără micorize (sus) : 1 = mantaua fungică ; 2 = rețeaua Hartig ; 3 = celule epidermice ; 4 = țesut vascular (după Chilvers și Fryor, 1965).

sporifere au o importanță deosebită pentru răspîndirea fungilor de micorize în natură: cele de la *Pisolethus tinctorius* pot conține pînă la 75 g spori (respectiv > 1 miliard de spori/g), ce pot fi răspîndiți prin curenți de aer, apă etc. Ei rezistă peste 4 ani fără ca potențialul lor de a genera micorize să fie afectat.

**Rețeaua Hartig** reprezintă caracteristica structurală distinctivă a ectomicorizelor. Deși asigură un contact foarte strîns cu celulele gazdei, hifele rămîn, totdeauna, localizate între celulele cortexului, fără ca să producă infecții intracelulare.

## RELAȚIA STRUCTURALĂ DINTRE FUNGI ȘI PLANTA-GAZDĂ ÎN ECTOMICORIZE

Atkinson (1975) a demonstrat caracterul dinamic al relației dintre fungi și planta-gazdă, evidențiat, în special, prin particularitățile structurale ale zonelor de contact. Figura 129 evidențiază modificările secvențiale ale

unui ax radicular din ierarhia de diviziune medie sau inferioară, de la regiunea apicală spre cea proximală.

La apex, teaca fungică acoperă regiunea caliptrei axului radicular, formată din celule senescente degenerate și un strat de produși vii aparținînd celulelor inițiale ale meristemului. În această regiune, fungii sînt în contact direct cu celulele degenerate neviabile.

În zona imediat superioară, teaca fungică acoperă celulele epidermice vii pentru a forma zona premergătoare rețelei Hartig („Pre-Hartig net zone").

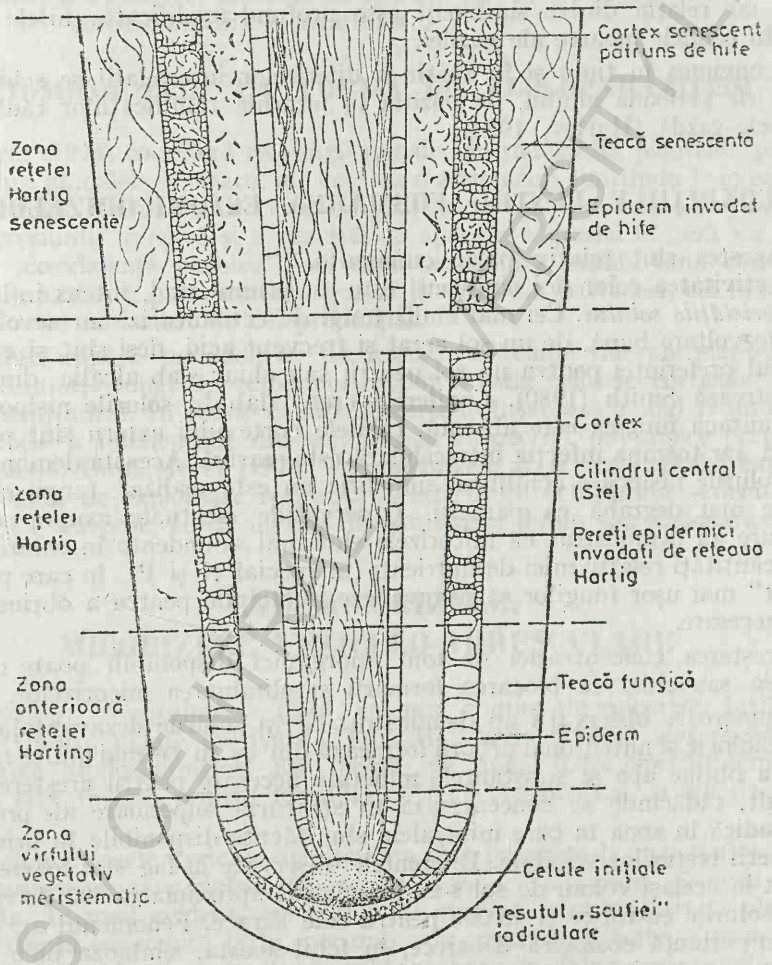



Fig. 129. — Reprezentarea diagramatică a zonelor de contact dintre fungi și planta-gazdă în ectomicorize. În zona extremității radiculare, fungii sînt în contact direct cu celulele senescente ale vîrfului vegetativ meristematic. În zona premergătoare rețelei Hartig, teaca fungică este în contact cu celulele epidermice vii, iar în zona rețelei Hartig, fungii pătrund între celulele epidermice și, uneori, între celulele corticale ca sisteme hifale vii. În zona rețelei Hartig senescentă, celulele epidermice și cele corticale sînt pătrunse de hifele fungice (după Harley, 1984).

BCU IAȘI CENTRU DE RESURSE PENTRU ISTORIA UNIVERSITĂȚII

Deasupra acesteia, începînd din regiunea în care celulele rădăcinii au atins mărimea caracteristică stadiului matur este zona rețelei Hartig. În această zonă, celulele fungice ale tecii și ale rețelei Hartig se găsesc într-un contact strîns și extensiv cu celulele corticale vii. Hifele fungice vii pătrund între celulele epidermice și, uneori, chiar între cele corticale.

În sfîrșit, deasupra acestei zone, într-o regiune în care atît stelul, cît și cortexul sînt și mai mult îngroșate, hifele fungice vii pătrund în celulele corticale senescente, pentru a forma zona ultimă a rețelei Hartig („Late Hartig net zone"). În această zonă, teaca fungică este, de asemenea, senescentă, iar relația dintre simbionți este profund modificată: hifele proliferează în celulele moarte ale gazdei.

Lungimea în timp și în spațiu a diferitelor interrelații se schimbă în funcție de perioada anului, de poziția în ierarhia ramificațiilor rădăcinii și de specia-gazdă (Harley, 1984).

## CONDIȚIILE PENTRU FORMAREA ECTOMICORIZELOR

Acestea sînt relativ puțin cunoscute.

Activitatea celor doi simbionți este în primul rînd, intens influențată de *proprietățile solului*. Cei mai mulți fungi de ectomicorize au nevoie, pentru o dezvoltare bună, de un sol aerat și frecvent acid, deși sînt și excepții, în sensul preferinței pentru un sol neutru sau chiar slab alcalin, după cum demonstrează Smith (1980). Coniferele cresc slab în solurile nisipoase, în care mantaua fungică este absentă, celulele cortexului extern sînt pline de taninuri, iar toamna infecția intracelulară este masivă. Aceasta demonstrează că în solurile nisipoase echilibrul simbiotic nu este realizat, fungii comportîndu-se mai degrabă ca paraziți. Observațiile efectuate asupra solurilor de pădure au demonstrat că micorizele sînt mai abundente în solurile care conțin cantități relativ mici de nutrienți (în special N și P), în care plantele „permit" mai ușor fungilor să le invadeze rădăcinile pentru a obține mineralele necesare.

Creșterea concentrației de ioni anorganici disponibili poate duce la inhibarea sau chiar la blocarea formării și eliminarea micorizelor.

Numeroase observații au demonstrat că în solurile dezavantajate sub raport biologic și nutrițional arborii formează din ce în ce mai multe radicele pentru a obține apa și substanțele minerale necesare pentru creștere. Ceva mai mult, rădăcinile se concentrează în straturile superioare ale profilului de sol, adică în zona în care mineralele sînt făcute disponibile în urma descompunerii resturilor vegetale. Diferențele observate la fag sînt foarte mari: raportat la același volum de sol s-au înregistrat aproximativ 500 de radicele pentru solurile eutrofice și 45 000 pentru cele sărace. Fenomenul are o deosebită importanță ecologică deoarece, în felul acesta, simbioza bine echilibrată prin micorize permite arborilor să progreseze spre soluri și regiuni cu calități suboptimale.

**Factorii genetici**, care determină natura fungilor și tipul de micorize formate, nu au fost determinați în mod univoc. Intervenția lor este certă, deoarece examinarea rădăcinilor de arțar și stejar care cresc alăturat într-o pădure arată că, totdeauna, arțarul prezintă endomicorize, în timp ce stejarul ectomicorize (Smith, 1980).

Intervenția unui factor genetic este sugerată și de faptul că 28 de specii de *Basidiomycetes*, care includ *Boletus edulis*, *Rhizopogon*, *Pisolithus tinctorius*, formează ectomicorize cu coniferele și endomicorize arbutoide cu *Arbutus* și *Arctostapylos*, în funcție de localizarea extracelulară la unele gazde și intracelulară la altele.

În alte cazuri, unele plante-gazdă aparținînd acelorași specii (*Acacia*, *Acer*, *Alnus*, *Fraxinus*, *Myrica*, *Populus*, *Salix* etc.) pot forma cu unii fungi, simultan sau alternativ, micorize ectotrofe sau micorize veziculo-arbusculare.

În mod asemănător, plantele de *Arbutus* și *Pinus* pot forma fie ectomicorize, fie ectoendomicorize arbutoide.

## ECTOMICORIZELE CA FORMĂ DE ALELOPARAZITISM

Meyer (1974) consideră că fungii pătrund în rădăcinile plantelor pentru a-și procura glucidele necesare, iar acestea reacționează limitîndu-le expansiunea. Existența simbiotică a celor doi parteneri este posibilă atît timp cît forța „agresiunii" fungice și a reacției de apărare a gazdei asigură un echilibru, o „coexistență pașnică", de care beneficiază ambii. Cînd condițiile de mediu se modifică și favorizează numai pe unul din parteneri, cel mai slab este exploatat mai mult de cel privilegiat.

Astfel, după o perioadă de uscăciune, rădăcinile fine ale plantei sînt slăbite. Anumiți fungi de ectomicorize pot invada celulele corticale, utilizîndu-le conținutul. În aceste cazuri, micorizele încetează a mai fi un organ de absorbție a nutrienților din sol. Fungii respectivi pot aduce prejudicii plantei-gazdă. După Meyer (1974), ectomicorizele ar fi mai degrabă expresia unui fenomen de exploatare reciprocă — este drept echilibrată — decît unul de beneficiu reciproc, adică un caz de parazitism dublu sau aleloparazitism.

## ENDOMICORIZELE. MICORIZELE VEZICULO-ARBUSCULARE

Acestea reprezintă tipul cel mai comun de micorize, întîlnit la cele mai multe plante cultivate. După Haiskaylo (1972), sînt prezente la majoritatea angiospermelor. Ele includ, pe lîngă toate speciile lemnoase, care nu sînt incluse printre familiile ce fac ectomicorize, și mii de plante ierboase.

Endomicorizele veziculo-arbusculare sînt prezente la mai multe genuri de gimnosperme, care includ: *Cupressus*, *Thuja*, *Taxodium*, *Sequoia*, *Juniperus* etc. În mod evident, cel mai mult studiate sînt micorizele plantelor cu importanță economică (grîu, porumb, soia, mazăre, tomate, căpșuni, măr, piersic, graminee furajere, trestie de zahăr, arborii de cafea, ceai, cauciuc etc.).

Fungii care produc aceste endomicorize sînt larg răspîndiți în sol, mai ales în regiunea periradiculară și în rizosferă. Poziția lor sistematică este încă controversată, datorită faptului că majoritatea nu cresc în culturi pure. Descriși inițial pe criterii pur convenționale, sub denumirea de *Rhizopagus*, au fost redescriși de Peyronel (1923, 1937) ca aparținînd familiei *Endogonaceae* (*Phycomycetes*).

Marea similaritate anatomică a micorizelor veziculo-arbusculare a dus la presupunerea, larg răspîndită, că cele mai multe, dacă nu chiar toate, sînt produse de o specie unică de fungi (Mosse, 1973). Ulterior însă, au fost descrise mai multe specii de *Endogone (E. vesiculifera, E. fuegiana, E. mosseae* etc.), iar experiențele de inoculare au întărit convingerea că acest tip de micorize sînt produse de specii diferite și, probabil, chiar de genuri diferite de fungi. În anul 1973, Gerdemann și Trappe au descris patru genuri de *Endogonaceae* denumite: *Glomus, Sclerocystis, Gigaspora* și *Acaulospora*, capabile să producă micorize endotrofe. Cel mai frecvent întîlniți sînt cei din genul *Glomus*, care colonizează rădăcinile plantelor, cresc de-a lungul suprafeței lor, formînd apresori pornind de la care hifele pot pătrunde în celulele radiculare. După Mosse (1973), toți membrii grupului *Endogone* formează sporocarpi, cu structură și număr de spori variabili în funcție de specie. Frecvent, unele specii formează chlamidospori la extremitatea unei hife nediferențiate.

La plantele de căpșun, sporii rotunzi sau piriformi (∅ 60—250 μm) sînt inclavați grupat într-o masă de hife întrețesute lax, care formează matricea sporocarpilor hipogei. Ei apar izolat în sol sau pe rădăcini.

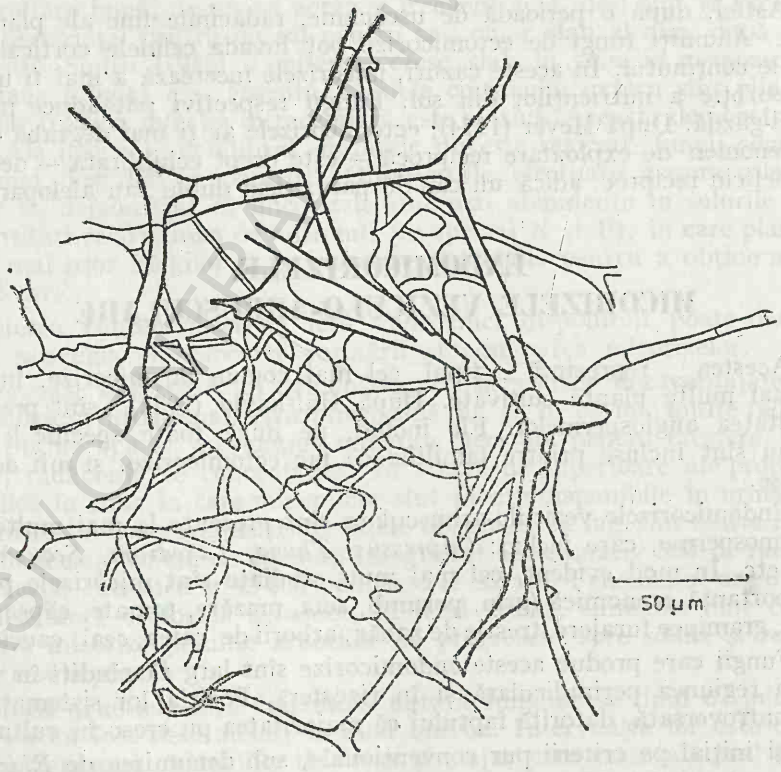



Fig. 130. — Micorizele. Reprezentarea schematică a matricei hifale a sporocarpului, evidențiind ramificările caracteristice și anastomozele hifelor (după Mosse, 1956).

În regiunile temperate, numărul lor (20—90/g sol uscat) este supus unor variații sezoniere, în funcție de stadiul de vegetație a plantei, cu un maximum în lunile iulie — septembrie și un minim în aprilie.

Sînt dispersați prin rădăcinile plantelor și prin deplasarea apei, a insectelor sau a altor organisme animale. Frecvent, sporocarpii prezintă conexiuni hifale de la distanță cu rădăcinile plantei (fig. 130).

Bonfante-Fasolo, Marzachi și Tests (1986) au demonstrat rolul important al peretelui sporal în biologia fungilor. El nu este inert și pasiv, ci, din contră, activ, modulabil și sensibil la condițiile de mediu. Este gros și cu structură complexă în sol, unde sporii supraviețuiesc timp îndelungat ca și la hifele care contactează plantele înainte de infecție. El se modifică complet și devine subțire și amorf în momentul stabilirii unei simbioze funcționale. În anul 1974, Gerdemann și Trappe, revizuind statutul familiei *Endogonaceae*, ajung la concluzia, oarecum paradoxală, că fungii din grupul *Endogone* nu ar forma micorize veziculo-arbusculare, ci, mai degrabă, ectomicorize pe anumiți arbori. Cu toate acestea, numele de *Endogone* continuă să fie folosit convențional și în prezent, în literatura de specialitate, pentru toți fungii care produc micorize veziculo-arbusculare.

### Specificitatea interacțiunii simbiotice

Experimentele de inoculare a plantelor cu suspensii sporale axenice au demonstrat că cei mai mulți fungi au un spectru larg de gazde. Astfel, *E. mosseae* formează micorize cu peste 20 de specii-gazdă. Există însă și excepții: fungii din micorizele de la ovăz nu pot fi transmiși la orz și invers. În schimb, cei izolați de la grîu sau de la secară infectează ambele plante. Este surprinzător faptul că fungii simbionți aproape obligați prezintă o specificitate de gazdă atît de redusă. Fenomenul s-ar explica prin larga lor distribuție în sol și printr-o proprietate fundamentală a metabolismului radicular comună multor plante.

## FORMAREA MICORIZELOR VEZICULO-ARBUSCULARE

Micorizele endotrofe de acest tip poartă acest nume deoarece formează structuri sferice, numite *vezicule*, și structuri ramificate cu funcția de organ absorbtiv de tipul haustorilor, numite *arbusculi*.

În evoluția infecției simbiotice au fost descrise trei faze succesive:

1) dezvoltarea extensivă în sol a miceliului extraradicular, cel puțin cîțiva cm la suprafața rădăcinii;

2) apariția unui sistem hifal intercelular în cortex;

3) infecția intracelulară și formarea de hife încolăcite, vezicule și arbusculi în celulele vegetale.

Rădăcinile infectate au o culoare mai întunecată decît cele neinfectate.

Inițial, fungii cresc sub formă de hife individuale sau de rețele laxe, pe suprafața rădăcinilor pe care le colonizează, fie formînd apresori, fie ramificîndu-se repetat, pentru a forma o diseminare de preinfecție, de la care se formează, de asemenea, apresori ce stimulează infecția. Procesul este favorizat de producerea de către fungi a unor enzime celulozolitice, care dizolvă mici porțiuni din peretele celulelor vegetale. În rădăcină, hifele se răspîndesc, de regulă, longitudinal, inițial intercelular, pentru a forma o *unitate de infecție*, derivată de la un singur situs de infecție (Powell, 1977).

**Arbusculii** sînt sisteme complexe structural și funcțional similare haustorilor, formate prin ramificarea dihotomică repetată a hifelor în celulele corticale. Ei se formează de la o singură sau ocazional de la mai multe hife intracelulare, care iau naștere ca scurte ramificații laterale ale hifelor distributive mai groase, intercelulare (Mosse, 1963; Ruehle și Marx, 1979). La extremitățile lor, ramificațiile arbusculare fine pot fi invizibile la microscopul fotonic. Uneori, fiecare extremitate arbusculară este înconjurată de un „nor" de material granular, format din citoplasmă fungică dispersată în celula-gazdă.

Arbusculii sînt progresiv încapsulați într-un sistem de pereți, derivați din celula-gazdă, pentru a forma structurile numite inițial *sporangiole* („Sporangioles") sau „mase de digestie" („Digestion clumps"), în care fungii degenerați sînt separați de celula vie.

Celulele infectate cu arbusculi au un volum mărit, uneori de 4—5 ori. Plasmalema crește ca suprafață, iar nucleul este mărit și hipercrom. La unele din speciile studiate (ceapă, căpșun, măr), la care nucleul are normal diametrul de 3,4—4,6 μm, el poate crește în celulele cu arbusculi la 8,4—9,6 μm. Mărimea nucleului, determinată prin modificări osmotice sau de poliploidie poate avea loc chiar înainte de infectarea propriu-zisă a celulelor cu arbusculi (Cox și Tinker, 1976).

Arbusculii au o durată de viață limitată (4—10 zile), după care se turtesc și se lizează. După Smith (1980), aceste modificări reflectă fie digestia hifelor intracelulare și utilizarea nutrienților, prin transfer în celulele rădăcinii, fie o reacție de apărare a plantei față de parazitismul fungic. Fenomenul este important, în special, la orhidee, care formează micorize cu fungi capabili de nutriție saprofită și necrotrofie.

**Veziculele** sînt structuri sacciforme ce apar la extremitățile sau în mijlocul hifelor distributive. Adesea intercelulare și uzual multinucleate, ele prezintă conexiuni deschise cu hifa parentală.

În stadiile tinere au un perete inițial subțire și o citoplasmă omogenă. Ulterior, peretele devine mai gros, citoplasma, vacuolată, conține numeroase picături uleioase ce tind să se reunească în așa fel încît veziculele mature conțin o picătură unică, mare, de ulei înconjurată de o peliculă fină de citoplasmă la periferie. Uneori, veziculele sînt atît de mari încît proemină pe suprafața rădăcinii.

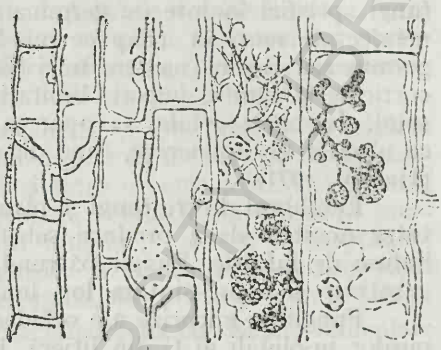
Funcția veziculelor este de depozit de ulei, utilizabil de către gazdă după degradarea arbusculilor. Mosse (1963), pe baza observației că pot fi utilizate pentru a inocula alte plante, le-a atribuit și o funcție reproductivă, ca sursă de propagule reproductive, după descompunerea rădăcinilor gazdei.

În cazul micorizelor veziculo-arbusculare, hifele miceliene ies din rădăcina infectată pentru a forma o rețea laxă în rizosferă și în solul adiacent. Greutatea hifelor extramatriceale este de 1—6% din greutatea rădăcinii proaspete. Lungimea hifelor în sol este corelată cu lungimea rădăcinii infectate. La trifoi, aceasta este apreciată la 1,29 m hife/cm rădăcină (Tisdall și Oades, 1979; Smith, 1980).

### Relația structurală dintre simbionți

Contactul dintre simbionții fiziologic activi în micorizele endotrofe pare să fie foarte asemănător celui observat în multe infecții fungice biotrofe ale plantelor.

Pe măsură ce hifele fungice infectante pătrund în celula-gazdă vie, peretele celulei vegetale și plasmalema par să se invagineze, în așa fel încît hifele sînt acoperite de un înveliș derivat din aceste structuri de suprafață. Se pare că fungii inhibă sau modifică activitatea enzimelor gazdei, implicate în producerea sau în maturarea peretelui celular. Aproape de locul său de intrare în celula-gazdă, hifa este înconjurată de un strat parietal, care pare să fie asemănător celui normal al acesteia. Pe măsură ce hifa sau arbusculul cresc, peretele devine tot mai subțire și între plasmalema gazdei și peretele hifal se dezvoltă o matrice extinsă *(matricea interfacială)*. Ea înconjură întreaga hifă, fie că este simplu încolăcită (fig. 131), fie arbusculară, chiar în cele mai fine ramificații. Matricea conține numeroase vezicule dispersate derivate aparent din plasmalema gazdei, și fibrile polizaharidice dispersate.



a b c d e f g

Fig. 131. — Reprezentarea schematică a modului de pătrundere a unor fungi de micorize în rădăcina plantelor de *Allium*. În primele două straturi de celule (**a** și **b**), miceliul fungic este intracelular, iar în al treilea și al patrulea (**c** și **d**) este intercelular. Între aceste straturi se dezvoltă un organ vezicular de depozit. În straturile al cincilea și al șaselea (**e** și **f**), fungii formează structuri ramificate intracelulare (arbusculi), care sînt digerați de celulele-gazdă (**g**) (după Meyer, 1966).

În toate cazurile, zona de contact implică participarea plasmalemelor vii ale ambilor participanți separate de un spațiu apoplastic, care constă din peretele hifal modificat și de o modificare mai mult sau mai puțin marcată a peretelui celulei-gazdă (Harley și Smith, 1983). Pe măsură ce asociația îmbătrînește, ea se comportă ca și cum fungii ar deveni mai puțin apți să mențină sau să genereze modificările caracteristice ale peretelui celulei-gazdă. Plasmalema acesteia continuă să elibereze vezicule care conțin polizaharide și să formeze polimeri fibroși, dar își recapătă capacitatea de a-i organiza într-o structură parietală coerentă. Arbusculii și hifele încolăcite devin progresiv încapsulate într-un sistem derivat din peretele celular al celulei-gazdă, descris anterior sub denumirea de „sporangiole".

**Reacția plantei.** Fungii de micorize endotrofe atacă planta-gazdă ca un parazit (Meyer, 1974), deoarece hifele intracelulare se comportă ca haustorii fungilor patogeni. Planta-gazdă încearcă să reziste la acest atac prin formarea de „bonete" („Cap") de substanță membranoasă la locul de pătrundere. Secreția localizată a acestei substanțe reprezintă o reacție de apărare.

În general, fungii rămîn localizați în straturile externe ale cortexului radicular. Cînd încearcă să pătrundă în structurile interne ale rădăcinii ei sînt normal distruși de rezistența gazdei, care determină dezintegrarea hifelor („Tolypophagy") sau a arbusculilor („Thamniscophagy"). Prin liza hifelor endofitului, planta-gazdă obține compușii organici fungici.

În mod normal, stelul și meristemul apical sînt lipsite de infecția fungică. De asemenea, endodermul plantei reprezintă pentru fungi o barieră insurmontabilă. Dacă o depășesc, ei devin paraziți.

## MICORIZELE ORHIDEELOR

Orhideele prezintă endomicorize produse de fungi aparținînd la *Basidiomycetes* și mai puțin, probabil, la *Phycomycetes*. După cum s-a demonstrat, embrionul orhideelor trebuie să fie „pătruns" de unul sau de mai mulți fungi specifici înainte de germinarea seminței (Hacskaylo, 1972). Semințele neinfectate mor, în timp ce cele infectate dobîndesc o stare de echilibru, germinează și dau naștere unei plante normale. Fungii pătrund în celulele corticale și rămîn, uneori, limitați numai la regiunile aflate în contact cu solul. În unele celule, ei apar ca hife sănătoase, active fiziologic, pentru ca ulterior să degenereze, fiind digerate și dezintegrate de activitatea gazdei (Harley, 1971).

Echilibrul dintre fungi și planta-gazdă pare să fie menținut de capacitatea acesteia de a produce substanțe antifungice (orchinol, hircinol etc.) induse de infecție. Fungii pătrund în celulele sănătoase care conțin aceste substrate și induc sinteza lor, limitînd extinderea infecției.

Fungii de micorize ale orhideelor sînt foarte activi în degradarea compușilor insolubili ai C din litieră, humus, lemne etc. Produșii rezultați sînt absorbiți, trec în organismul plantei, fiind folosiți de aceasta ca sursă de C. În mod paradoxal, unii dintre acești fungi *(Rhizoctonia* sp., *Armillaria mellea* etc.) sînt foarte virulenți pentru alte gazde.

După unii cercetători (Hadley, 1969), nu există probe care să demonstreze că infecția fungică a rădăcinilor, esențială inițial pentru creștere, este benefică pentru orhideele adulte.

Fungii respectivi sînt, în general, capabili să trăiască liber, separat de gazdă și, probabil, nu beneficiază de asocierea cu plantele. Harley (1971) consideră că micorizele orhideelor nu sînt asocieri efectiv simbiotice, ci, mai degrabă, o formă de parazitism precar echilibrat, care relevă un mecanism biochimic de reacție de apărare (sinteza de antifungice), indus de microorganisme. Este ca și cum în cursul evoluției lor, orhideele au dobîndit o modalitate de a utiliza fungii în propriul lor interes.

## MICORIZELE ERICOIDE

Au fost descrise la *Ericaceae (Vaccinium* sp., *Erica cinerea, Gaultheria* sp., *Rhododendron* sp. etc.). Fungii simbiotici sînt, în general, *Ascomycetes (Pezizzella ericae)*, unele *Phycomycetes* sau unele specii încă neidentificate (Harley, 1984). Deși multe ericacee au importanță economică, alimentară (afin, dafin etc.) sau medicinală ele sînt mai puțin studiate. De aceea, unele fenomene esențiale care stau la baza recunoașterii specificității și a compatibilității dintre cei doi parteneri sînt puțin cunoscute.

După Gianinazzi-Pearson, Bonfante-Fasolo și Dexheimer (1986), infecția evoluează în două faze succesive:

1) *Faza inițială, nespecifică*, determinată probabil de natura suprafeței hifelor, implică legarea fungilor de rădăcini. Procesul pare să fie mediat, în special, de rețeaua laxă de fibrile extracelulare — de natură necunoscută — produse la suprafața hifelor.

După cum s-a demonstrat, hifele, care produc cantități mari de material fibrilar, sînt foarte apte să infecteze plantele-gazdă. Ceva mai mult, după contactul cu planta, materialul fibrilar extracelular crește cantitativ și se organizează ca o teacă fibrilară ce vine în contact cu peretele celular

al gazdei, de care se ataşează. În etapa următoare, hifele se diferenţiază pentru a forma apresori, de la care se dezvoltă o hifă septată ce pătrunde prin peretele celular al celulelor vegetale.

2) În etapa următoare are loc *infecţia intracelulară*. Ea se bazează pe interacţiuni necunoscute, probabil între moleculele complementare, care asigură stabilirea unei compatibilităţi celulare specifice între cei doi parteneri. După un prim contact între peretele hifelor şi plasmalema gazdei, fungii pătrund, prin procese fizice şi enzimatice, în celulele vegetale.

Dezvoltarea lor are loc inter- şi intracelular, şi este limitată la celulele care înconjură cilindrul central al rădăcinii. Hifele formează spirale cu dezvoltare extensivă intracelulară şi, în acelaşi timp o reţea miceliană imensă pe suprafaţa rădăcinii şi în jurul ei. În general, celula-gazdă infectată exercită un anumit control asupra dezvoltării fungilor, care nu se răspîndesc lateral de la o celulă la alta în ţesuturile gazdei. În felul acesta, fiecare celulă conţine o unitate de infecţie individuală compusă din bucle şi spirale hifale.

**Micorizele arbutoide** sînt caracteristice ericaceelor cu sisteme radiculare mai groase *(Arbutus)*. Au fost descrise ca ectoendomicorize, deoarece au caractere comune cu micorizele ectotrofe (teacă fungică şi reţea Hartig) şi cu cele endotrofe ericoide (Harley, 1984).

## MICORIZELE ECTOENDOTROFE

Sînt prezente numai la speciile de arbori (brad, pin, molid) care formează, în mod obişnuit, ectomicorize. După Hacskaylo (1972) sînt mai frecvente în pepiniere decît în păduri.

Considerate iniţial ca forme de tranziţie, au particularităţile anatomice ale ambelor tipuri majore de micorize. Rădăcinile cu ectoendomicorize sînt adesea mai alungite, mai subţiri şi mai puţin ramificate dihotomic decît cele purtătoare de ectomicorize. Mantaua fungică nu este atît de bine dezvoltată. Micorizele ectoendotrofe prezintă concomitent reţea Hartig în cortex şi hife pătrunse intracelular. Fungii sînt probabil *Fungi imperfecti*.

Harley (1984) atrage atenţia asupra unui caz particular de micorize ectoendotrofe. El se referă la o specie aclorofiliană de *Monotropa (M. hypopitys)*, la care teaca fungică este bine dezvoltată. Reţeaua Hartig pătrunde prin pereţii celulelor epidermice în interiorul celulelor gazdei, prin intermediul unor haustori asemănaţi cu forma unui cui sau a unui ţăruş („Hyphal peg"). Structura iniţial simplă a haustorilor devine progresiv mai complexă şi final degenerează. În jurul lor, peretele celulei-gazdă este stimulat să formeze invaginări complexe de natură glucidică. Fungii izolaţi de la *M. hypophytis* formează ectomicorize cu arborii specifici, în aşa fel încît simbioza descrisă include trei parteneri: o plantă-gazdă principală (arborele fotosintetizator), *Monotropa* aclorofiliană şi fungii de ectomicorize.

## MICORIZELE PERITROFE

Au fost descrise iniţial de Dominik (1957), care a demonstrat că, frecvent, speciile de plante lipsite de simbionţi fungici naturali sînt înconjurate, invariabil, de un miceliu abundent, aparţinînd speciei *Cenococcum graniforme*, recunoscut drept capabil să intre în simbioză cu diferite plante.

Micorizele peritrofe sînt caracterizate prin prezența unor hife fungice, care înconjură rădăcina cu care au doar un contact superficial, fără nici o conexiune directă. Miceliile epirizice au o foarte mare zonă de extindere, putînd atinge aproximativ 4 m/mm³ de sol. Ele preiau nutrienții rezultați prin descompunerea resturilor radiculare necesari ca sursă de energie.

## ROLUL MICORIZELOR ÎN BIOLOGIA PLANTELOR

**„Discutarea inteligentă a înglobării nutrienților de către rădăcini implică luarea obligatorie în considerație a sistemelor de micorize, pe lîngă teoriile tradiționale asupra absorbției"**

E. HACSKAYLO

Prezența micorizelor conferă plantelor avantaje numeroase și diferite, între care cele legate de nutriție și dezvoltare sînt precumpănitoare.

Micorizele funcționează ca adevărate organe absorbtive radiculare asociate cu fungii („Joint fungus-root absorbing organs"). Deoarece rețeaua Hartig creează o mare suprafață de contact cu celulele vegetale, absorbția nutrienților este mult mai mare decît cea realizată prin perii radiculari. În plus, ramificarea rădăcinilor indusă de fungi crește și mai mult suprafața absorbantă, creînd, în același timp, situsuri adiționale de legare a hifelor. Rădăcinile infectate cu fungi de micorize sînt de 2—3 ori mai lungi decît cele neinfectate, mai grele și ramificate profuz (Mosse, 1962) (fig. 132). Formarea perilor radiculari este supresată, iar funcția lor este preluată de hifele fungice, care măresc raza de disponibilitate a nutrienților pentru plantă.

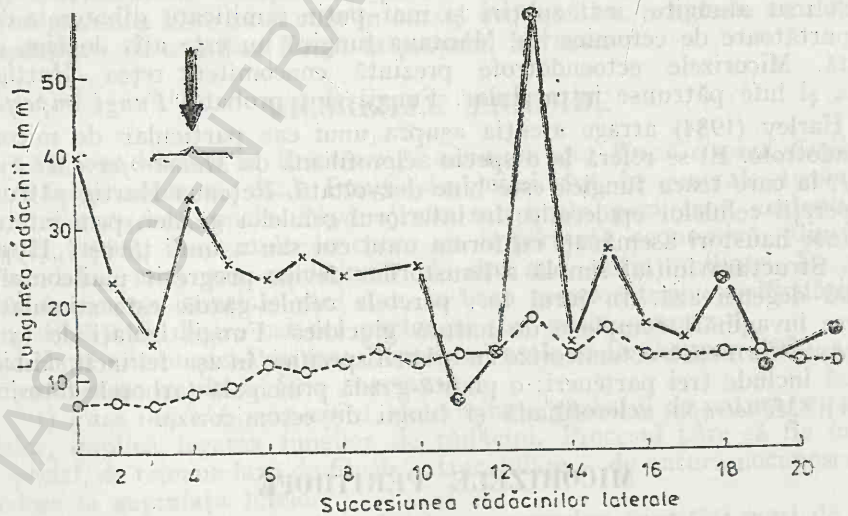



Fig. 132. — Influența micorizelor asupra dezvoltării rădăcinilor laterale de prim ordin la *Trifolium parviflorum* (media pe cîte douăzeci de plante). Linia continuă indică rădăcinile cu micorize (săgeata indică momentul inoculării fungilor). Linia întreruptă indică rădăcinile fără micorize (după Mosse, 1962).

— Înglobarea ionilor în organismele vegetale este guvernată de capacitatea de absorbție a rădăcinilor și de deplasarea lor în structura acestora. După Ruehle și Marx (1979), înglobarea ionilor foarte mobili (nitrat, sulfat, $K^+$) este în mare măsură asigurată de capacitatea de absorbție a rădăcinilor și poate fi realizată chiar cu o densitate relativ mică de rădăcini absorbante în profilul unui sol. În schimb, preluarea ionilor relativ stabili (fosfat, Zn, Cu, Mo și uneori $NH_4^+$) prin rădăcini este adesea un factor limitant pentru dezvoltarea plantelor.

Fungii de micorize au un rol foarte activ în preluarea nutrienților, în general, după cum s-a demonstrat, utilizînd compuși ai P, N, Ca și Na marcați radioactiv, care sînt preluați mai eficient și translocați în diferite regiuni ale plantei. Ei secretă metaboliți care măresc solubilitatea ionilor minerali legați din sol, astfel încît ionii anorganici sînt preluați eficient și translocați direct în rădăcini, prevenind pierderea lor prin spălare. Se realizează astfel un mecanism foarte eficient de „circuit închis de nutrienți" (Atlas și Bartha, 1987). Extensiile miceliale competiționează spațial mult mai eficient cu microorganismele din sol asigurînd absorbția și translocația în plantă a ionilor de Mg, Fe, Ca, K și Si, pe lîngă cei citați anterior. Mantaua fungică, structură caracteristică ectomicorizelor, acționează ca organ principal de acumulare înainte de transferul lor în rădăcină.

În mod particular, de prezența micorizelor beneficiază diferitele specii de arbori care au, comparativ cu cerealele și gramineele furajere, puține rădăcini și peri absorbanți, fapt care implică existența unor contacte reduse cu solul și cu soluțiile din el.

— Hifele fungice, larg răspîndite în sol, traversează regiunile „ineficiente", deficitare în nutrienți sau cu nutrienți inaccesibili, din apropierea rădăcinilor pentru a se ramifica și exploata zone noi, situate la distanță, inaccesibile plantei ca atare (fig. 133). Cu timpul, în jurul micorizelor apar

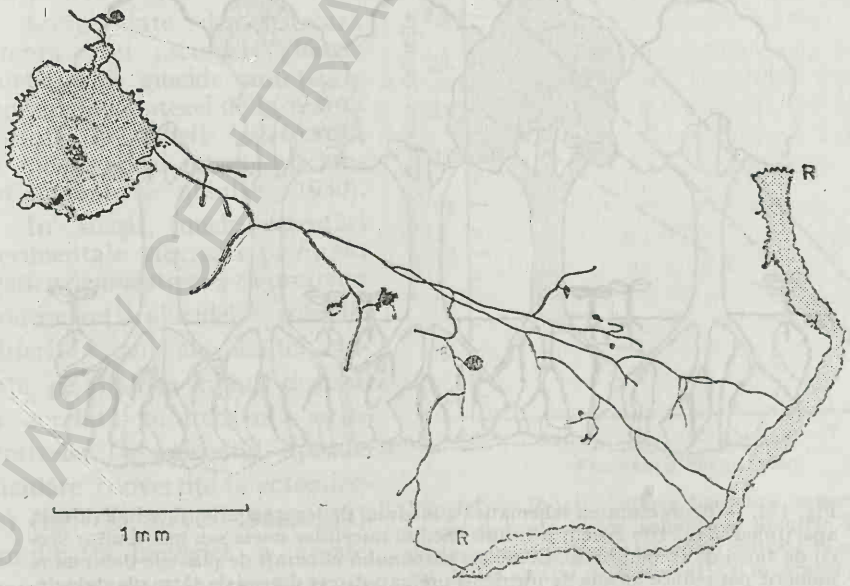



Fig. 133. — Reprezentarea schematică a conexiunii la distanță a unui corp fructifer fungic cu rădăcina (R) unei plante de căpșun (după Mosse, 1956).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY

noi zone de deficit de nutrienți, dar ramificarea și creșterea continuă a hifelor, ca și conexiunile lor cu solul permit exploatarea extensivă la distanță a acestuia. Procesul este mult mai avantajos energetic per unitate de suprafață absorbantă decît creșterea și ramificarea rădăcinilor (Harley, 1984).

— Efectul cel mai frecvent observat la diverse plante este cel de stimulare a creșterii lor, comparativ cu cele lipsite de micorize. El ține de absorbția mărită a nutrienților, prin creșterea suprafeței absorbtive (în cazul ectomicorizelor) și/sau prin producerea de „canalicule" în structura rădăcinii (în cazul celor endotrofe), prin care nutrienții pot migra mai ușor.

În cursul simbiozei, fungii produc multe substanțe care mențin echilibrul simbiotic cu celulele radiculare. Ei secretă substanțe de tip auxinic ca, de exemplu, acid β-indolacetic, utilizînd ca precursor triptofanul sau, uneori, chiar în absența acestuia. Aceste substanțe sînt răspunzătoare de modificările anatomice caracteristice micorizelor, rezultate din interacțiunea auxinelor fungice cu anumiți metaboliți ai plantei. Fungii produc, de asemenea, o serie de citokinine, care împiedică maturarea și suberizarea rădăcinilor infectate, favorizînd prelungirea vieții lor, fiziologic active, mai îndelungate decît a celor fără micorize.

Stimularea creșterii este asociată frecvent cu o mărire a conținutului lor în nutrienți, atribuită unei nutriții minerale ameliorate.

Unele plante purtătoare de micorize (tutun, căpșun, porumb etc.) se maturează mai rapid decît cele lipsite de micorize (fig. 134) (Daft și Okusanya, 1975).

Menge și colab. (1978) au descris chiar un fenomen de dependență a gazdei de micorize („Mycorrhyzal dependency") în sensul creșterii ei în greu-

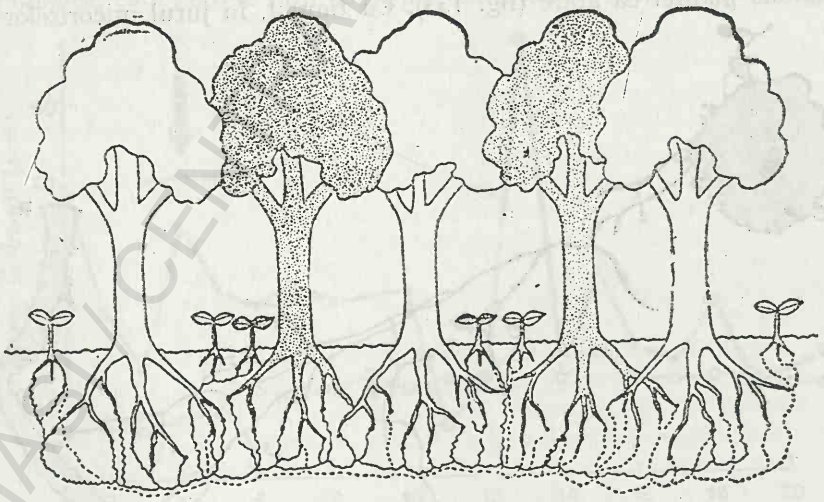


Fig. 134. — Reprezentarea schematică a modului de legare a arborilor individuali, aparținînd la diferite specii, prin intermediul miceliilor uneia sau mai multor specii de fungi de ectomicorize. Compușii carbonului eliberați de plantele dominante numeric pot reduce nevoia de nutrienți preluați direct din sol de către plantele dezavantajate de condițiile de mediu (de exemplu iluminare slabă). În felul acesta, competiția dintre specii depinde de relațiile lor cu fungii (după Harley, 1984).

tate, bazată, în principal, pe creșterea concentrației compușilor cu C. Dependența ține nu numai de intensitatea fotosintezei, ci și de cantitatea de fotosintat care trece spre fungi.

## Fiziologia glucidelor în ectomicorize

Numeroase fapte de observație și cercetări experimentale au demonstrat dependența simbiontului fungic heterotrof de produșii fotosintetici ai gazdei.

Între acestea, cele mai semnificative sînt următoarele:

Formarea ectomicorizelor este încetinită sau stopată cînd sinteza glucidelor sau translocația lor în rădăcină este împiedicată. În timp ce un excedent de glucide în rădăcini este esențial, blocarea accesului lor prin sugrumarea tulpinii unui pin tînăr oprește imediat infecția rădăcinilor de către fungi și formarea micorizelor.

În mod asemănător, reducerea intensității luminii solare sub 23% diminuează formarea micorizelor, în timp ce reducerea la 6% o inhibă complet.

Experiențele cu $^{14}CO_2$ au demonstrat, fără echivoc, trecerea fotosintatului marcat în mantaua micorizelor. După aproximativ 24 de ore, el este găsit sub forma a trei glucide de tip fungic, absente la plante — manitol, trehaloză și glicogen. În felul acesta, fungii de micorize realizează o derivație metabolică prin conversia glucidelor gazdei (glucoză, fructoză, zaharoză) la forme insolubile, pe care planta nu le poate utiliza.

Aceste date demonstrează existența unei „scurgeri" foarte importante de glucide sintetizate în cursul fotosintezei de la planta autotrofă la fungii heterotrofi, prin membranele intacte ale ambelor organisme (Smith, 1980).

În sfîrșit, unele cercetări experimentale efectuate pe *Fagus sylvatica* demonstrează că prezența și concentrația glucidelor solubile în diferite organe ale plantei, cultivată pe diferite tipuri de sol, sînt corelate cu frecvența ectomicorizelor (= procentul apexuri radiculare convertite în ectomicorize) (fig. 135, Meyer, 1962, 1974). Semnificația biologică a acestei dependențe este ilustrată și de faptul că, după Harley (1971),

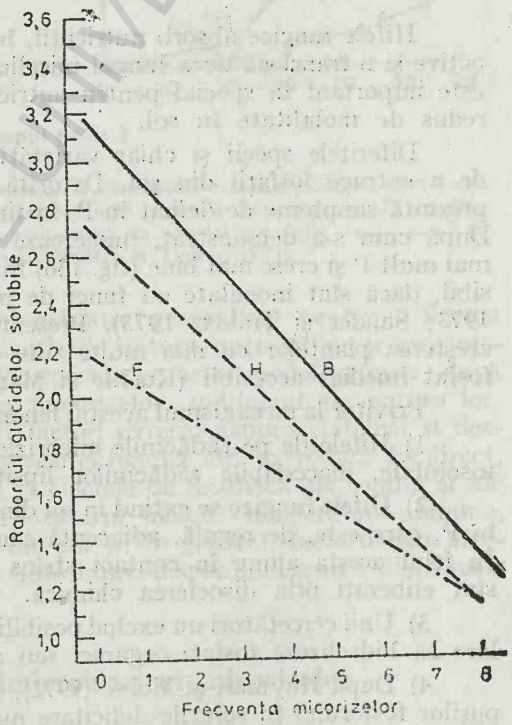



Fig. 135. — Relația dintre frecvența micorizelor și raportul glucidelor solubile în plantele și rădăcinile fagului (*Fagus sylvatica*) cultivat în orizontul B, în stratul de humus (H) și în stratul expus fermentațiilor (F) dintr-un sol brun eutrofic (după Meyer, 1974).

fungii de micorize ar prelua la fag aproximativ 90% din funcția de absorbție a nutrienților din sol.

Sintetizînd datele cele mai noi referitoare la biochimia glucidelor în cazul plantelor cu ectomicorize este cert caracterul complex al interacțiunii celor doi simbionți, evidențiat și de următoarele fenomene:

1) fungii de micorize produc auxine, care măresc concentrația glucidelor în rădăcinile plantelor;

2) intervin în metabolismul glucidic, mărind translocația acestora în rădăcini și stimulînd circulația mai intensă și mai rapidă a fotosintatului decît în rădăcinile lipsite de micorize;

3) acționează ca o derivație metabolică, transformînd glucidele plantei în forme specifice neutilizabile de către aceasta.

Rezultatul acestor interacțiuni complexe este mărirea conținutului în glucide solubile al rădăcinilor infectate comparativ cu cele fără micorize. Astfel, la *Pinus resinosa*, translocarea fotosintatului radioactiv (marcat cu $^{14}C$) în rădăcini este de 54% la plantele cu micorize, față de numai 5% la cele fără (Nelson, 1964; Meyer, 1971).

## Rolul micorizelor endotrofe în metabolismul fosforului

Hifele fungice absorb nutrienții, în general, prin mecanisme metabolice active și îi translocă de-a lungul miceliului pînă la planta-gazdă. Fenomenul este important în special pentru nutrienții imobili sau cei cu un coeficient redus de mobilitate în sol.

Diferitele specii și chiar varietăți de plante diferă în capacitatea lor de a extrage fosfații din sol. Datorită acestei particularități, unele plante prezintă simptome de deficit în P, în timp ce altele se dezvoltă foarte bine. După cum s-a demonstrat, numeroase specii de plante studiate înglobează mai mult P și cresc mai bine (fig. 136) în soluri care conțin puțin fosfat accesibil, dacă sînt inoculate cu fungi de micorize veziculo-arbusculare (Mosse, 1973; Sander și Tinker, 1973). Prezența speciilor de *Endogone* stimulează creșterea plantelor cu mai multe sute de procente în solurile deficitare în fosfat imediat accesibil (Ruehle și Marh, 1979).

Privitor la mecanismul acestui fenomen au fost emise mai multe ipoteze:

1) Hifele de pe rădăcinile micorizice pot să absoarbă fosfatul în forme insolubile, inaccesibile rădăcinilor lipsite de micorize;

2) Hifele fungice se extind în sol dincolo de zona deficitară sau epuizată în P, care este, de regulă, adiacentă sau apropiată de suprafața radiculară. În felul acesta ajung în contact strîns cu teritorii în care ionii de fosfați sînt eliberați prin disocierea chimică.

3) Unii cercetători nu exclud posibilitatea ca micorizele veziculo-arbusculare să hidrolizeze fosfați organici sau anorganici insolubili.

4) După Hayman și Mosse (1972), factorul limitant al înglobării compușilor fosforului în solurile deficitare nu este capacitatea rădăcinilor de a-i prelua, ci viteza mică de deplasare a lor în sol și, deci, incapacitatea ionilor de P de a ajunge la nivelul suprafețelor absorbante. În cazul micorizelor veziculo-arbusculare, miceliul extern mărește foarte mult volumul solului explorat, acționînd ca o suprafață adițională foarte mare per unitate de volum.

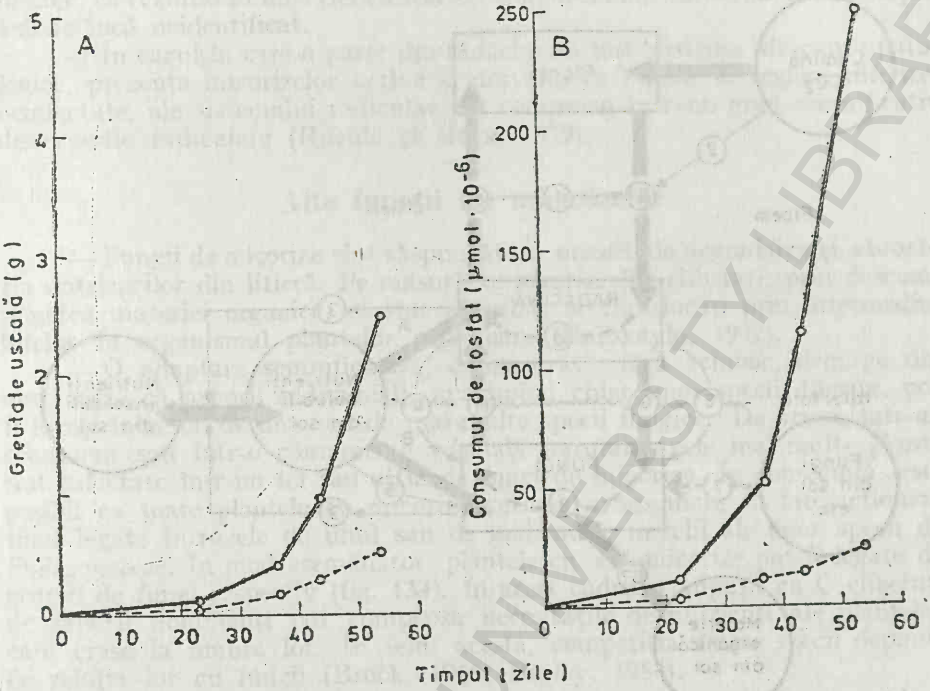



Fig. 136. — Influența micorizelor asupra plantelor. **A.** Greutatea uscată a plantelor de *Allium cepa* cu (———) și fără micorize (— — —) în cursul unei perioade de creștere de 54 de zile. **B.** Cantitatea de fosfat per vas de vegetație absorbită de aceeași populație cu (———) și fără micorize (— — —) (după Sanders și Tinker, 1973).

Figura 137 prezintă un model calitativ generalizat pentru a ilustra interacțiunile dintre simbionți în funcție de natura nutrienților și mecanismele de reglare prin feedback. Parțial speculativ, acest model permite, după Smith (1980), înțelegerea fiziologiei micorizelor, indiferent de natura lor. El scoate în evidență influența unor factori externi asupra stabilirii și dezvoltării micorizelor, a biomasei componentei fungice etc. exercitată fie direct, fie prin intermediul plantei, precum și efectele de feedback ale solului și ale stării de nutriție a plantei. Factorii externi includ: temperatura, lumina, concentrația și natura nutrienților din sol și, în general, factorii care afectează fotosinteza și cantitatea de fotosintat disponibil pentru distribuția în plantă.

## Rolul protector antimicrobian al micorizelor

— Fungii au un rol protector, formînd o barieră fizică ce împiedică accesul patogenilor. Mantaua fungică acoperă părțile mai fragile ale radicelelor, fără să lase nici o breșă, împiedicînd, în acest fel, orice contact direct al rădăcinilor tinere cu solul. Chiar nutrienții absorbiți trebuie să străbată rețeaua de hife încîlcite în drumul lor spre rădăcină. În absența mantalei

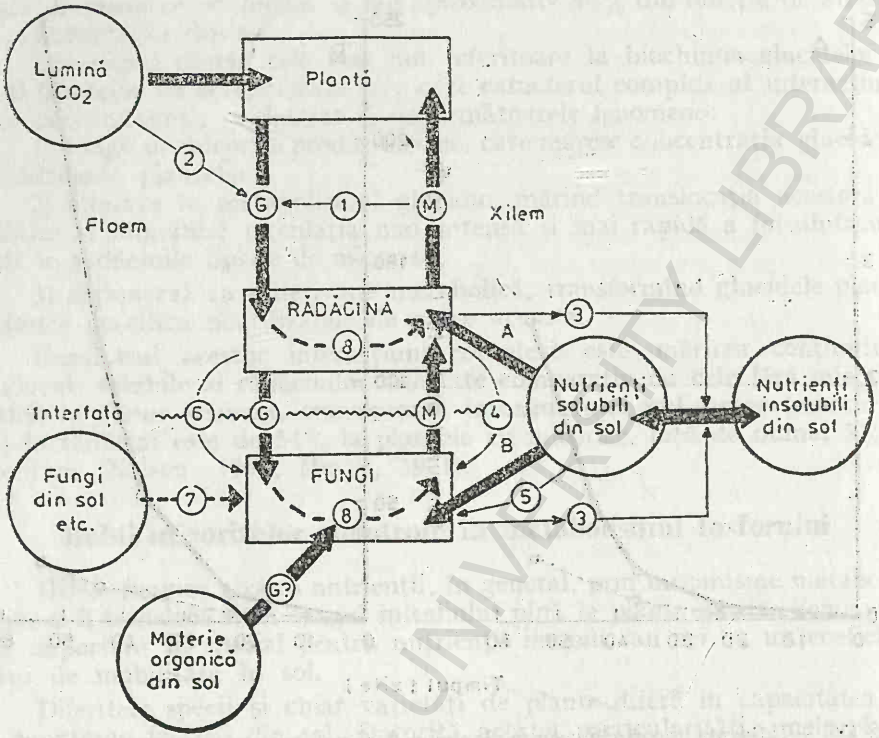



Fig. 137. — Model calitativ de ilustrare a relațiilor dintre plante și fungii de micorize (după Smith, 1980): G = fluxul glucidelor; M = fluxul nutrienților minerali; A = absorbția mineralelor direct în rădăcini: B = absorbția mineralelor pe calea hifelor fungice (situsuri mai numeroase și afinitate mai mare); 1 = efectul de feedback al concentrației nutrienților în plantă asupra distribuției substanței uscate între rădăcină și restul plantei; 2 = efectul luminii asupra aceleiași proprietăți; 3 = efectele rădăcinii și ale hifelor (enzime, acizi organici, $K^+$) asupra disponibilității nutrienților din sol; 4 = efectul de feedback al concentrației nutrienților minerali din rădăcină asupra dezvoltării micorizelor; 5 = efectul de feedback al concentrației nutrienților minerali din sol asupra dezvoltării micorizelor; 6 = efectul de feedback al concentrației glucidelor radiculare asupra dezvoltării micorizelor; 7 = efectele complexe ale densității rădăcinilor, ale temperaturii și ale umidității solului asupra dezvoltării micorizelor; 8 = reciclarea carbonului de la rădăcini sau fungi. Săgețile groase indică fluxul de materiale; săgețile subțiri efecte de feedback (după Smith, 1980).

fungice, datorită peretelui celular foarte fin, rădăcinile tinere sînt invadate și colonizate chiar de patogeni puțin virulenți, iar planta încearcă să se apere, sintetizînd substanțe antifungice ca taninul. Or, lipsa perilor radiculari indusă de infecție și impregnarea celulelor vegetale cu tanin afectează funcția absorbtivă a rădăcinii, determinînd creșterea mai puțin viguroasă a plantei.

— Mulți fungi de micorize produc acizi organici volatili cu efect fungistatic și antibiotice, care limitează dezvoltarea microorganismelor, menținînd un echilibru între fungii simbiotici și cei patogeni din sol (Marx, 1966). Astfel, antibioticele produse de *Leucopaxillus cerealis* sînt active pe mai multe bacterii și fungi, inclusiv pe zoosporii de *Phytophtora cinnamoni*. Orhideele

produc, ca rezultat al infecției cu *Rhizoctonia*, orchinol, cumarină și un compus fenolic încă neidentificat.

— În cazul în care o parte din rădăcini au fost distruse de cauze patologice, prezența micorizelor active și dezvoltarea hifelor în regiuni diferite, neinfectate, ale sistemului radicular pot compensa într-un grad semnificativ distrugerile radiculare (Ruehle și Marx, 1979).

## Alte funcții ale micorizelor

— Fungii de micorize sînt răspunzători, uneori, de degradarea și absorbția nutrienților din litieră. Pe măsură ce aceștia sînt eliberați, prin descompunerea materiei organice, ei sînt absorbiți și translocați prin intermediul hifelor în organismul plantelor superioare (Hacskaylo, 1972).

— O adaptare semnificativă, demonstrată fără echivoc, decurge din observația că arborii individuali, aparținînd chiar unor specii diferite, pot fi legați între ei, de una sau de mai multe specii fungice. De aceea, într-un ecosistem sau într-o comunitate vegetală naturală, cele mai multe plante sînt infectate într-un fel sau altul de fungi de micorize. În consecință, este posibil ca toate plantele cu micorize veziculo-arbusculare să interacționeze fiind legate între ele de unul sau de mai multe micelii ale unor specii de *Endogonaceae*. În mod asemănător, plantele cu ectomicorize pot fi legate de grupul de fungi respectiv (fig. 134). În acest cadru, compușii cu C eliberați de arborii dominanți pot compensa necesitățile de nutrienți ale plantelor care cresc la umbra lor. În felul acesta, competiția dintre specii depinde de relația lor cu fungii (Brock, 1966; Harley, 1984).

— Miceliul extramatriceal al fungilor din micorizele veziculo-arbusculare are un rol important în sol în legarea granulațiilor de nisip și în stabilizarea dunelor de nisip (Nicolson și Johnston, 1976; Smith, 1980). Hifele favorizează formarea de agregate de sol, avînd astfel un rol important în dezvoltarea structurii solului.

— Datorită acestei acțiuni complexe este explicabil de ce, spre exemplu, coniferele lipsite de micorize se dezvoltă slab, rămîn mici sau nu se dezvoltă deloc. Introduse în soluri utilizate mult timp exclusiv pentru agricultură sau tratate cu agenți cu efect biocid nu se pot dezvolta sau se dezvoltă slab. Încetarea creșterii nu poate fi evitată prin irigare și nici cu îngrășăminte, ci numai prin adăugarea fungilor de micorize, respectiv cu sol de pădure.

**Semnificația biologică a micorizelor** este încă controversată. Pentru mulți cercetători, evoluția lor bine definită este consecința unor forme avansate de simbioză mutualistă echilibrată, avantajoasă pentru ambii parteneri. Acțiunea și interacțiunea celor doi parteneri de-a lungul evoluției lor comune a dus la un echilibru competitiv benefic atît pentru fungi, cît și pentru plante. În unele cazuri, asocierea are un caracter obligatoriu, în altele, plantele pot supraviețui și în absența partenerului simbiotic. Este cert că în faza în care celulele fiziologic active ale celor doi parteneri sînt în contact intim și numai în ea, există un transfer bidirecțional de substanțe (Smith, 1980). În această fază, cei doi simbionți au o suprafață maximă de contact intim între celulele lor vii. Înainte de această fază, contactul este limitat. După sfîrșitul ei, fie fungii, fie celulele gazdei, fie ambele degenerează (Harley, 1984).

## ECOLOGIA MICORIZELOR

„Asociațiile de micorize sînt atît de prevalente încît plantele fără micorize sînt mai degrabă o excepție decît o regulă"

E. HACSKAYLO

Numai cîteva familii de plante superioare, în special *Cruciferae* și *Chenopodiaceae*, precum și plantele acvatice sînt lipsite de micorize. Celelalte sînt total sau parțial infectate cu intensitate variabilă, deși unele exemplare individuale pot scăpa de infecție din cauza unor condiții de mediu sau de altă natură. Intervenția fungilor de micorize în procesele de absorbție a nutrienților din sol este fundamentală pentru comportarea lor ecologică. Fără micorize, multe plante, inclusiv unele specii importante pentru horticultură și silvicultură, nu pot supraviețui în comunitățile biologice dinamice înalt competitive, prezente în habitatele naturale din sol.

Geografic, cele mai răspîndite sînt micorizele veziculo-arbusculare, fapt care face ca introducerea lor în habitate noi să nu ridice probleme speciale. Ectomicorizele sînt limitate, cu anumite excepții minore la speciile arborescente și arbuști. Ele se întîlnesc în regiunile temperate nordice și sudice, subarctice și în regiunile montane. Micorizele arbutoide au o limitare și mai restrînsă, dar oarecum similară, iar cele ericoide, limitate la arbuști, sînt caracteristice mediilor mai aspre, cum sînt solurile sărace din climatele severe cu scurte perioade favorabile sezoniere (Harley, 1984).

### Aplicații ale efectelor micorizelor în agricultură, silvicultură și horticultură

**„Afirmația că un copac îndepărtat din sol este numai o parte a plantei întregi nu este integral metaforică. El reprezintă o parte îndepărtată chirurgical din organul absorbtiv și digestiv rizosferic".**

S. A. WILDE

Posibilitatea exploatării efectelor favorabile ale micorizelor asupra creșterii plantelor a fost mult studiată în ultimele două decenii. Ea are la bază observația că absența sau dezvoltarea insuficientă a micorizelor pot limita creșterea plantelor. După cum s-a demonstrat experimental, introducerea fungilor de micorize în solurile în care acestea lipsesc sau se găsesc în număr mic este urmată de stimularea creșterii plantelor respective (fig.138).

Inocularea artificială cu fungi de ectomicorize este indicată în cazul împăduririi regiunilor anterior lipsite de arbori, a regiunilor de mare altitudine, a solurilor neprielnice și nutrițional adverse, precum și în cazul introducerii în cultură a unor specii exotice într-o regiune în care speciile res-

pective lipsesc complet. În aceste situații, inocularea cu pământ recoltat din regiunile în care speciile respective cresc normal dă rezultate superioare celei efectuate cu culturi fungice pure (Marx, 1980; Smith, 1980).

Utilizarea fungilor de micorize veziculo-arbusculare este mai limitată și încă neaplicată pe scară mare, deși s-a demonstrat că prezența lor atenuează simptomele de deficit nutritiv la unele specii (piersic, *Citrus* sp.), cînd acestea se dezvoltă în soluri anterior expuse agenților biocizi.

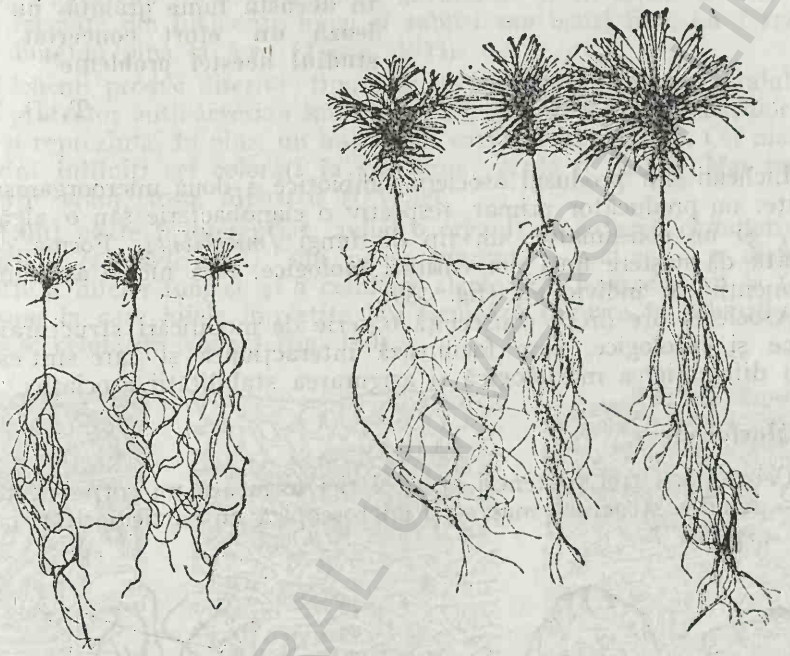


Fig. 138. — Influența fungilor de micorize asupra dezvoltării la *Pinus strobus* L. *Stînga* : plante în vîrstă de nouă luni menținute două luni într-o soluție nutritivă sterilă și transplantate direct într-un sol de pajiște (lut prăfos). *Dreapta* : aceleași plante inoculate în solul de pajiște, după menținerea timp de două săptămîni în sol de pădure (după Wilde, 1968).

Crearea artificială a micorizelor ecto- sau endotrofe s-a dovedit deosebit de utilă în cazul colonizării plantelor pe reziduurile unor mine metalifere, ale unor exploatări de cărbune și, în general, pe habitate „marginale" (Smith, 1980).

Producerea artificială a micorizelor cu fungi foarte eficienți reprezintă o alternativă față de chimizarea solului, prin creșterea eficienței de preluare a nutrienților și reducerea nevoii de administrare a îngrășămintelor, putînd asigura dezvoltarea unor plante care altfel tolerează greu soluri cu fertilitate scăzută sau diferite sisteme perturbate.

# SIMBIOZA CIANOBACTERII—FUNGI SAU ALGE—FUNGI. LICHENII

**„Din nefericire, încetineala cu care se desfășoară funcțiile lichenilor, în această lume grăbită, nu stimulează un efort concertat pentru studiul acestei probleme"**

T. D. BROOK

Lichenii sînt produsul asocierii simbiotice a două microorganisme neînrudite: un producător primar, respectiv o cianobacterie sau o algă *(ficobiont)*, și un consumator, un tip de fungi *(micobiont)*. Forma complet integrată dă naștere unei noi entități biologice, fără nici o asemănare cu componenții săi individuali (fig. 139).

Asocierea are drept consecință o serie de modificări structurale, biochimice și fiziologice, care facilitează interacțiunea și care sînt esențiale pentru diferențierea morfologică și asigurarea stabilității asociației.

## Morfologie

Cei doi sau trei parteneri ai asociației formează un corp vegetativ — *talul* — avînd o structură macro- și microscopică cu particularități caracteristice „speciei".

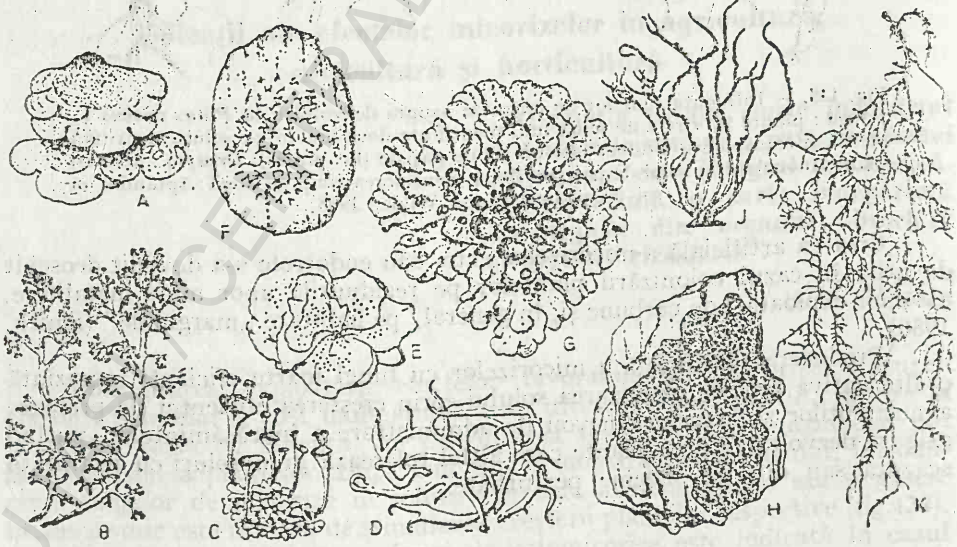



Fig. 139. — Simbioze creatoare de nou: lichenii. **A** *Dictyonema pavonia*. **B.** *Cladonia rangiferina*. **C.** *Cladonia pyxidata*. **D.** *Thamnolia vermicularis*, **E.** *Dermatocarpon miniatum*. **F.** *Graphis scripta*. **G.** *Parmelia acetabulum*. **H.** *Rhizocarpon geographicum*. **J.** *Roccella boergesenii*. **K.** *Usnea florida* (din Denffer și colab., 1983).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În funcție de acestea au fost descrise trei tipuri majore de licheni:

1) *Crustoși* (engl. „Crustose"), având un tal format din cruste mici, numite areole, strîns aderente de substratul subiacent.

2) *Frunzoși* (engl. „Foliose"), cu tal lamelar, foliaceu, având aspectul unor frunze ce aderă de substrat prin intermediul unor structuri caracteristice de legare — rizinele (conglomerate de hife fungice) similare rizoizilor.

3) *Tufoși sau fructiculoși* (engl. „Fruticose"), cu aspect de tufe ramificate, formate din filamente lungi și subțiri sau benzi fine. La *Usnea* pot atinge lungimi pînă la 5 m (Jahns, 1973).

Lichenii produc diferite tipuri de pigmenți care colorează talul. Unii au rol protector antibacterian sau de reducere a intensității radiațiilor luminoase și reprezintă, în plus, un important caracter taxonomic. Cel mai frecvent sînt întîlniți cei colorați în gri, brun, verde și galben. Mai rari sînt pigmenții oranj, roșu, albastru și violet.

Talul poate fi diferențiat, avînd o organizare internă caracteristică a țesuturilor *(tal heteromer)* sau poate prezenta — mai rar — o distribuție aleatorie a hifelor fungice și a celulelor algale *(tal homeomer*, ca la *Collema pulposum* la care hifele împletite lax formează o rețea în ochiurile căreia se găsesc celule de *Nostoc)* (fig. 140).

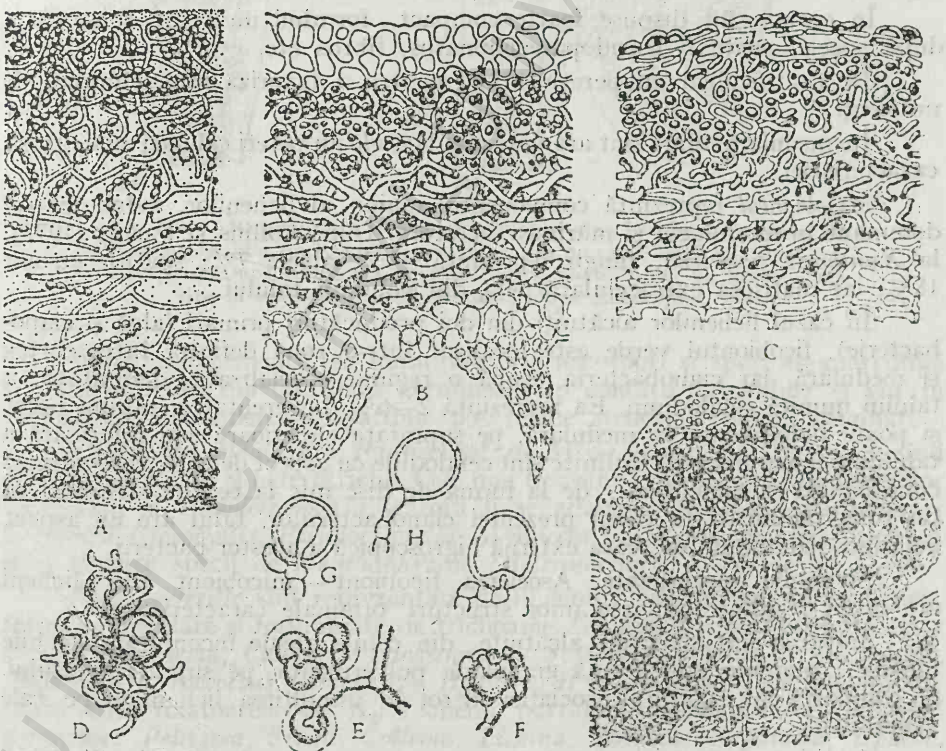



Fig. 140. — Lichenii. **A.** *Collema pulposum*. **B.** *Sticta fuliginosa*. **C.** *Graphis dendritica*. **D.** *Sorédii de Parmelia sulvata*. **E — J.** Diferite tipuri de haustori. **K.** Cefalodiu de *Peltigera aphtosa* (din Denffer și colab., 1983).

Cea mai mare parte a talului este alcătuită din hifele fungice, care formează un strat de țesut specializat, rezultat din împletirea strînsă a hifelor — *cortexul superior* sub care se găsesc o regiune — *medulara* — și adesea un *cortex inferior*, *hipotal* și *rizine*.

Lichenii crustoși nu au, niciodată, cortex inferior, fiind atașați de sol, de stînci sau de scoarța copacilor, direct prin intermediul hifelor din medulară. Contactul este atît de intim încît sînt foarte greu de disociat.

Regiunea medulară *(medula)* rezultă dintr-o împletitură laxă a hifelor, în ochiurile căreia se găsește stratul algal. Ea reprezintă regiunea în care este stabilit contactul fizic dintre partenerii simbiozei. Are o capacitate de reținere a apei mult mai mare decît oricare alt constituent al talului și de stocare a nutrienților solubili, probabil datorită faptului că hifele sînt mai lax aranjate decît în alte regiuni. Datorită acestor particularități, la nivelul ei, metabolismul este mult mai activ, fapt evident mai ales în perioadele de uscăciune. Prezența unei concentrații mai mari de glucide în medulară la *Peltigera polydactyla* demonstrează că produșii fotosintezei trec de la producătorul primar fotosintetic în această regiune, care poate funcționa ca un compartiment de stocare a glucidelor.

*Hifele fungice* pot diferi mult ca formă și aranjament între diferitele regiuni.

În cortex sînt dispuse foarte compact, formînd un țesut dens, care, după specie, poate fi pseudoparenchimatos, fibros etc.

În stratul algal au pereți subțiri pentru a favoriza interschimbul de nutrienți.

În medulară, unde sînt aranjate mai lax, ele au pereți celulari mai groși, caracteristici.

*Micobiontul* reprezintă componentul major al lichenilor, avînd un rol dominant în morfologia și mărimea acestora. După Collins și Farrar (1978), la *Xanthoria parietina*, fungii reprezintă 43%, algele 7%, spațiile cu aer 18%, iar matricea extracelulară 34% din volumul talului.

În cazul lichenilor alcătuiți din doi producători primari (algă și cianobacterie), ficobiontul verde este localizat într-o zonă definită între cortex și medulară, iar cianobacteria ocupă o regiune specializată, delimitată, a talului numită cefalodium. Ea reprezintă 2—6% din greutatea talului uscat și poate fi localizată în medulară, pe suprafața superioară sau inferioară a talului. Cel mai frecvent întîlnite sînt cefalodiile cu aspect de gale, care variază considerabil ca dimensiuni, de la forma de disc mic la cea de structuri ca un tufiș ramificat. În cazul prezenței cianobacteriilor, talul are un aspect gelatinos determinat de teaca externă higroscopică a acestor bacterii.

**Structuri specializate.** Asocierea ficobiont — micobiont din licheni are drept rezultat formarea unor structuri originale caracteristice:

*Sorediile* sînt structuri alcătuite din celule algale înconjurate de hife fungice, prezente sub formă granulară, pulverulentă, pe suprafața talului. Se comportă ca „spori" ai asociației cu rol în înmulțirea lichenilor pe cale vegetativă.

*Izidiile* apar ca mici protuberanțe sau excrescențe ale talului, cilindrice, globuloase sau coraloide. Au aceeași structură ca și talul respectiv, conțin celule algale și țesut medular acoperit de cortex.

### Înmulțirea lichenilor

Se realizează pe cale vegetativă prin fragmente, soredii și izidii, care ajunse în medii favorabile refac structura originară a asociației (fig. 141).

Alga se multiplică în stratul algal prin diviziune mitotică și prin aplanospori (Jakns, 1973), care sînt eliberați prin ruperea peretelui celulei-mamă.

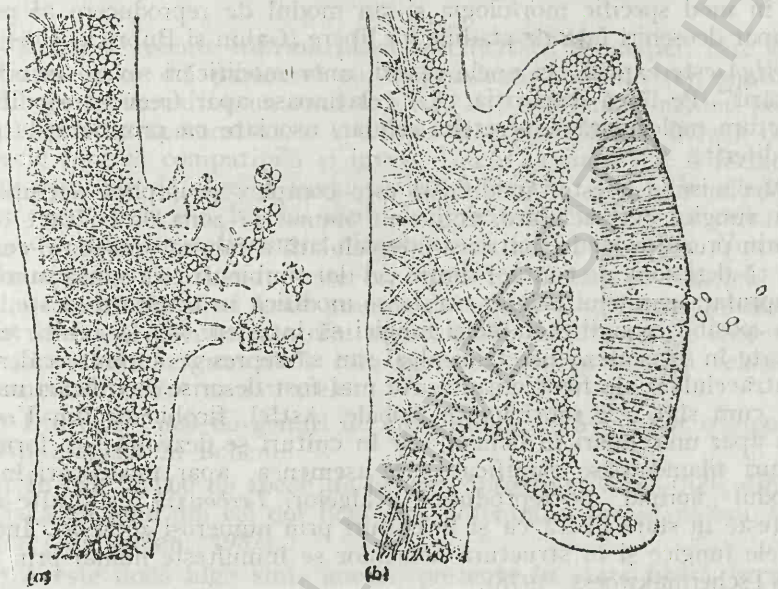



Fig. 141. — Reproducerea lichenilor prin eliberarea sorediilor compuse din filamente și hife fungice (a) și prin eliberarea de spori fungici (în acest caz, ascospori). După germinare, miceliul fungic poate forma un lichen, dacă vine în contact cu o celulă algală (după Ahmadjian, 1963).

Fungii „lichenizați" se înmulțesc prin ascospori și spori asexuați după ce sînt eliberați din tal. Dacă germinează în condiții favorabile și vin în contact cu alge libere compatibile pot reface structura talului originar.

*Partenerul algal* este reprezentat de 34 de genuri de alge, incluzînd forme unicelulare și heterotriche. Cele mai frecvent întîlnite aparțin genurilor *Trebouxia* și *Pseudotrebouxia*, cărora li se adaugă *Chlorella*, *Asterochlorix*, *Leptosira*, *Gloeocystis*, *Pseudochlorella*, *Myrmecia* ș.a. A fost descrisă prezența unei singure specii de *Xanthophyceae (Heterococcus)*.

*Cianobacteritle* sînt reprezentate de 10 genuri, care includ, de asemenea, forme unicelulare și formatoare de trichoame. Cel mai frecvent întîlnite sînt: *Nostoc*, *Stigonema*, *Calothrix*, *Dichethrix* și *Scytonema*, cărora li se adaugă: *Anacystis*, *Chroococcus*, *Gloeocapsa*, *Hyella* și *Hyphomorpha*. Cele mai importante sînt fixatoarele de $N_2$. Lichenii purtători de cianobacterii aparțin genurilor: *Peltigera*, *Sticta*, *Collema*, *Lichina*, *Lobacea*, *Nephroma*, *Ephebe*, *Massalingia*, *Placynthrium*.

Unii licheni *(Lobaria)* conțin doi producători primari, respectiv o algă *(Trebouxia)* și o cianobacterie *(Nostoc)*.

Fungii din licheni sînt, în general, din clasa *Ascomycetes*. Mai rar sînt întîlniți fungi din clasa *Basidiomycetes* (~ 20 de specii).

Izolați, cresc greu în culturi de laborator. În unele cazuri sînt necesare chiar mai multe luni pînă la apariția unor colonii cu diametru de 1—2 cm (Galun și Bubrick, 1984).

**Consecințele asocierii simbiotice** sînt multiple. Fiecare partener afectează în mod specific morfologia și/sau modul de reproducere al celuilalt, încît apar deosebiri față de stadiile lor libere (Galun și Bubrick, 1984).

*Alga* este expusă, în unele cazuri, unor modificări severe în urma „lichenizării". Pe lîngă dispariția tecii gelatinoase apar frecvent modificări în arhitectura moleculară a peretelui celular, asociate cu proprietățile citochimice diferite.

Mecanismul acestor modificări este complex și implică acțiunea unor enzime fungice extracelulare, active nu numai la zona de contact cu alga, ci și prin prezența lor în matricea intercelulară a talului; dovada o constituie faptul că deși zona de contact dintre cei doi simbionți reprezintă numai 20% din suprafața peretelui celular acesta se modifică în totalitate. Este, de asemenea, posibil ca unii metaboliți fungici să interfere sau să inhibe enzimele implicate în biosinteza peretelui algal sau să represeze anumite căi metabolice intracelulare ale ficobiontului. Au mai fost descrise modificări mai complexe, cum sînt cele morfologice globale. Astfel, ficobionții din *Verrucaria maura* apar unicelulări în licheni, dar în culturi se dezvoltă sub forma unor structuri filamentoase ramificate. De asemenea, apar modificări în raport cu modul „normal" de reproducere a algelor. *Trebouxia*, ca și alte alge, se înmulțește în stare liberă ca și în culturi prin numeroși zoospori. Încercuită de hifele fungice și în structura lichenilor se înmulțește numai prin aplanospori (Tschermakwoess, 1978).

*Cianobacteriile* sînt, de asemenea, afectate atît în ceea ce privește morfologia, creînd dificultăți de identificare, cît și în aspectul ciclului de dezvoltare. La *Heppia echinulata*, cianobacteria *Scytonema* normal filamentoasă și cu heterochiști, este redusă la forma unicelulară fără heterochiști. În alte cazuri se adaugă diferențe semnificative sub raportul mărimii celulelor și al distribuției intracelulare a unor constituenți cum sînt tilacoizii, corpii poliedrici, granulele de cianoficină etc.).

*Fungii* simbiotici prezintă diferențe structurale și metabolice față de formele lor libere. Una dintre cele mai caracteristice, totdeauna absentă la fungii cultivați în laborator, este prezența constantă a unor *corpi concentrici* („Concentric bodies"), evidențiați în citoplasmă pe secțiuni ultrafine. Fiecare „corp concentric" este alcătuit, după Galun și Bubrick (1944), dintr-o regiune centrală („Core"), translucidă, înconjurată de un material mai dens, delimitat de o structură cu aspect de membrană. El este subdivizat în două sau mai multe regiuni distincte, zona externă fiind, în general, înconjurată de structuri radiare și, uneori, de un „halo" extern. Dispuse în grupuri, aceste structuri sînt situate într-o matrice care apare pe electronografii ca avînd o consistență diferită de citoplasma înconjurătoare, deși nu sînt separate de o membrană. Modul de formare este necunoscut. Sînt probabil de natură proteică.

### Specificitatea asociației

Ideea specificității simbiozei admisă de vechii specialiști este, în prezent, contestată. Ea se baza pe observația că marea majoritate a lichenilor constau dintr-o specie de fungi asociată cu un anumit taxon morfologic al unui gen de alge. Smith (1963, 1965) nu excludea posibilitatea ca specificitatea fungilor să se poată extinde la anumite tulpini fiziologice ale unui taxon morfologic.

Datele mai recente infirmă ideea specificității asociației, care implică interacțiunea celor doi parteneri cu exclusivitate absolută (un simbiont se asociază riguros numai cu un anumit altul, alte combinații nefiind posibile). Or, după cum s-a demonstrat, o specie de alge poate forma licheni cu orice altă specie fungică compatibilă și invers. Unele asociații pot fi formate din populații multiple de alge și fungi (Atlas și Bartha, 1987). În sfîrșit, alga *Trebouxia* este prezentă la mai mult de jumătate din lichenii descriși, iar 5—10% din toți lichenii conțin cianobacterii (cel mai adesea *Nostoc* sp.).

Mai aproape de realitate este concepția lui Galun și Bubrick (1984), care admit existența unui grad anumit de selectivitate între micobiont și ficobiont în sensul unei interacțiuni preferențiale, bazată tot pe fenomene de recunoaștere. Între argumentele care pledează pentru această relație, cele mai semnificative sînt următoarele:

1) Din cele 1 600 de genuri de alge, numai ~ 34 se pot comporta ca potențiali asociați în licheni.

2) În cele 20 000 de specii de licheni, aproximativ 50—70% din fungi se asociază cu unul din cei doi ficobionți potențiali: *Trebouxia* sau *Pseudotrebouxia* (Ahmadjian, 1982).

3) Aceste două alge sînt, uneori, prezente în stare liberă în natură, dispersate printre numeroase alte tipuri de alge. Cu toate acestea, ele sînt singurele care se asociază cu fungii pentru a forma simbioze.

4) Toate celelalte alge libere care colonizează același habitat ca și lichenii se multiplică în jurul talului, pe el sau sub el și sînt foarte rar sau niciodată încorporate în licheni. Dacă sînt încorporate, ele aparțin ficobionților prezenți în tal.

Existența unei selectivități în faza de contact a interacțiunii fungi/alge a fost demonstrată și la nivelul molecular, prin evidențierea lectinelor la mai mulți licheni la care au fost cercetate. Nu se știe dacă acest proces are caracter universal, dar este cert că *Peltigera polydactyla* posedă lectine care leagă selectiv receptorii complementari de pe suprafața cianobacteriilor *Nostoc* sau *Glococapsa alpicola*. În plus, Bubrick și colab. (1981) au izolat din fungi cultivați *in vitro* o proteină de legare a algelor, care se leagă selectiv de pereții celulari ai ficobionților cultivați izolat, dar proveniți din aceeași familie sistematică de licheni ca și micobiontul. Ea nu leagă alge care cresc libere în natură și nici alge cultivate, provenite din alte familii taxonomice de licheni. Proteina de legare este prezentă în hifele corticale ale lichenilor, ca și în pereții celulari ai micobiontului cultivat liber *in vitro*, ceea ce demonstrează că formarea ei nu este dependentă de simbioză. Ea are rol în asocierea selectivă a celor doi parteneri, participînd în faza inițială de recunoaștere a ficobionților potențiali, legîndu-i de hifele fungice (Galun și Bubrick, 1984).

## RELAȚIILE FIZICE DINTRE SIMBIONȚI

Unicitatea simbiozei ectotrofe din licheni, în raport cu alte forme de simbioză cunoscute rezidă în participarea celor doi parteneri pentru a forma o unitate morfologică alcătuită din două compartimente separate. Ei reprezintă un caz tipic de compartimentare metabolică (Srere și Mosbach, 1974).

Relațiile fizice dintre simbionți sînt variabile, de la simpla apropiere la contactul strîns intercelular, perete la perete, pînă la formarea de organe specializate fungice — *haustori* — care pătrund în celulele algale, asigurînd preluarea rapidă a metaboliților (fig. 102).

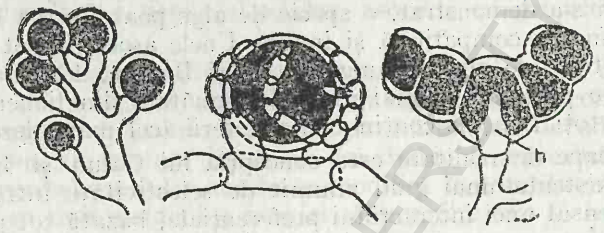



Fig. 142. — Reprezentarea schematică a principalelor forme de cuplare între alge ( ● ) și fungi în structura lichenilor : h = haustori (după Srere și Mosbach, 1974).

Cazurile de asociere laxă sînt relativ rare, ca la *Coenogonium*, și implică prezența unor hife nemodificate sau ramificate, care acoperă suprafața algelor, sau contactul prin intermediul tecilor externe gelatinoase ale cianobacteriilor. La cele mai multe specii predomină contactul strîns între simbionți, în care hifele fungice „învelesc" alga și ambii parteneri au un perete celular fin pentru a facilita transferul nutrienților.

Tschermak (1941) a descris două tipuri de haustori:

1) **Haustorii intracelulari** pătrund în protoplastul algelor. Peretele celular al acestora pare împins spre interior și final este rupt, probabil, prin efect mecanic. Peretele celular al haustorului intracelular rămîne intact, dar este mai subțire decît cel al hifei din afara algelor, probabil pentru a facilita transferul de substanțe organice. Celula algală se mărește, formează pereți celulari groși, uneori își pierde conținutul celular și odată cu aceasta viabilitatea. În alte cazuri, alga supraviețuiește, își reface peretele celular și amputează haustorii care se dezintegrează.

Haustorii intracelulari sînt întîlniți constant la unii licheni *(Lecidea parasema, Lecania candicans* etc.) și numai facultativ la alții.

2) **Haustorii intramembranari** sînt prezenți la lichenii cu talul bine structurat. Ei nu pătrund în protoplast, ci rămîn localizați în peretele extern al algelor. Acestea își refac adesea peretele lezat la locul perforației, iar alga supraviețuiește.

După Galun și Bubrick (1984) există o corelație între gradul de diferențiere a lichenilor și intimitatea relațiilor dintre simbionți.

La lichenii primitivi, toate algele, indiferent de faza ciclului lor de viață (tinere, mature, senescente sau în curs de degradare), pot fi invadate de haustori intracelulari. Pe măsură ce diferențierea devine mai evidentă, numărul algelor penetrate de haustori scade progresiv, în așa fel încît în formele mai

evoluate ale lichenilor, celulele algale tinere și sănătoase nu sînt invadate. Sînt atacate numai celulele în care a început dezintegrarea cloroplastelor sau cele care au ajuns la stadiul de senescență. În cazul lichenilor frunzoși și fructiculoși, haustorii sînt prezenți numai în celulele care încep să se descompună.

Se apreciază, în consecință, că prezența haustorilor și pătrunderea lor în celulele algelor nu este un fenomen obligatoriu. De altfel, chiar cînd există, procentul celulelor invadate este mic, iar numărul haustorilor per celulă este de maximum 5.

## RELAȚIILE FIZIOLOGICE DINTRE SIMBIONȚI

Natura interrelațiilor fiziologice dintre simbionții din licheni este relativ puțin cunoscută. Deși probele experimentale sînt reduse, a priori s-a admis că, cel puțin în anumite condiții ecologice speciale, simbioza s-ar baza pe un schimb de substanțe, prin care fiecare partener ar avea un efect benefic asupra asociatului său.

Ficobiontul reprezintă sursa principală de C organic, prin fotosinteză satisfăcîndu-și propriile exigențe și cedînd excedentul fungilor. Fotosinteza algelor din licheni are un ritm lent. Ele conțin de 4—10 ori mai puțină clorofilă per volum sau per greutate, comparativ cu celulele din frunzele verzi (Galun și Bubrick, 1984). Asimilarea $CO_2$ este, de asemenea, mai lentă decît la alte plante. Richardson (1973) apreciază ca valori medii la unele plante superioare 10—24 mg $CO_2/dm^2/oră^{-1}$, în timp ce la lichenul *Hypogymnia physodes* este de numai 0,44—3,8 mg $CO_2/dm^2/oră^{-1}$.

Lucrînd cu fragmente de tal de *Peltigera polydactyla* și *Nostoc*, Smith și Drew (1965) au demonstrat că [$^{14}$C]-glucoza este formată în zona „algală", iar după ~ 45 de minute la lumină migrează în zona fungică din medulară (fig. 143). Cianobacteriile eliberează și transferă glucoza, care este rapid convertită în microbiont la manitol.

Hill (1972), precum și Richardson (1973) au adus probe experimentale în sprijinul afirmației că *Nostoc* nu eliberează direct glucoză, ci formează în afara plasmalemei un glucan. Acesta este hidrolizat, de o enzimă extracelulară produsă de micobiont, la glucoză, care este rapid convertită, în hife, la manitol (fig. 144). Conversia glucidelor sintetizate la manitol creează un gradient de concentrație, care favorizează „fluxul" glucozei de la cianobacterii spre hifele fungice.

Natura producătorului fotosintetic determină tipul de glucid care trece din compartimentul algal în cel fungic. Algele verzi transferă ribitol ($C_5$), eritritol ($C_4$) și sorbitol ($C_6$), care sînt convertiți în fungi la manitol și arabitol. Ele se comportă, după Farrar (1980), ca parteneri altruiști, deoarece

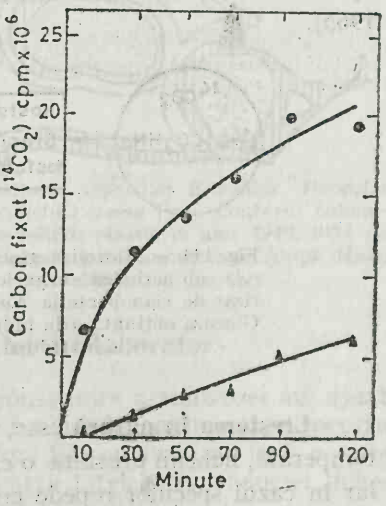



Fig. 143. — Fixarea $^{14}CO_2$ de către componentul algal (●) în cursul fotosintezei și transferul în regiunea medulară (▲) a lichenilor (după Smith și Drew, 1965).

la *Xanthoria parietina*, spre exemplu, 80—90% din C fixat prin fotosinteză este transferat la fungi. În cazul lichenului *Lobaria*, care conține atît alga *Trebouxia*, cît și cianobacteria *Nostoc*, sînt transferate ambele tipuri de produși (glucoză și polioli). De menționat că în stare liberă nici cianobacteriile și nici algele nu elimină produșii fotosintezei (glucoză și respectiv polioli) în mediu sau eliberează cel mult cantități neînsemnate, deoarece îi folosesc pentru creștere sau îi depun ca rezervă celulară. Aceasta sugerează că simbioza induce modificări în metabolismul lor, permițînd transferul fotosintatului prin procese de difuzie facilitată.

*Metabolismul azotului*. Lichenii au două surse de N: 1) N organic sau anorganic absorbit din mediu și 2) $N_2$ atmosferic fixat de cianobacterii. Lichenii cu cianobacterii fixatoare de $N_2$ conțin mai mult N decît cei cu alge. Galun și Bubrick citează lucrările lui Green și colab. (1980) după care cianolichenii *(Sticta* sp.) conțin 3,4% N/greutate uscată a talului, în timp ce *Pseudocyphellaria* conține numai 0,5% (cefalodiile pot conține chiar o cantitate mai mare).

*Contribuția fungilor* este mai puțin cunoscută. Ei au o mare capacitate de absorbție a apei, fie rapid (cînd este în stare lichidă), fie lent (ca vapori). Variațiile conținutului talului în apă sînt corelate cu cele ale mediului și pot oscila, datorită comportării lui, ca un gel hidrofil între 100 și 300% din greutatea uscată, iar în perioadele de secetă, datorită evaporării, pînă la 5%. La saturație, cea mai mare parte din apă este reținută extracitoplasmatic, în spațiile interhifale și în pereții groși ai hifelor. Datorită acestei mari capacități de absorbție a apei, lichenii pot acumula activ nutrienți organici și anorganici chiar din soluții foarte diluate.

Conținutul în apă este important prin influența sa asupra respirației și fotosintezei. Viteza maximă de asimilare este întîlnită cînd conținutul în apă este sub limita de saturație (reprezentînd 65—90% din aceasta, Smith, 1965).

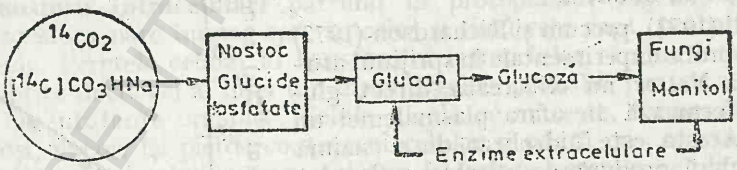



Fig. 144. — Hidroliza glucanului produs în lichenul *Peltigera polydactyla* sub acțiunea enzimelor fungice extracelulare. Glucanul este sintetizat de cianobacteria *Nostoc* sp. prin fotosinteză, în prezența $^{14}CO_2$. Glucoza obținută prin hidroliza lui este convertită la manitol în micobiont (după datele lui Richardson, 1973).

**Creșterea în natură** este, în general, foarte lentă (fig. 145). În regiunile temperate, lichenii prezintă o creștere radială medie mai mică de 1—2 mm/an, iar în cazul speciilor repede crescătoare *(Peltigera* sp.) de 2—4,5 cm/an. Lichenii crustoși cresc foarte lent și pot rămîne mai mulți ani nemodificați. În unele regiuni antarctice, probabil datorită condițiilor riguroase și absenței nutrienților, există cazuri în care nu apare nici un semn de creștere timp

de 30 de ani. Creșterea lentă este frecvent corelată cu condițiile climatice: umiditate mare, ceață și temperaturi reci moderate, care favorizează creșterea.

Mai mulți factori au fost incriminați pentru a explica dezvoltarea neobișnuit de lentă a lichenilor:

1) viteza mică de creștere a celor doi simbionți individuali și necesitatea creșterii lor echilibrate;

2) viteza lentă de asimilare a $CO_2$ și cantitatea redusă de energie metabolică disponibilă pentru procesele de biosinteză;

3) viteza redusă de turnover a proteinelor;

4) substratul sărac în nutrienți pe care se dezvoltă;

5) condițiile de mediu neadecvate, care permit numai scurte perioade de activitate metabolică optimă;

6) pierderea relativ rapidă a apei în climatul uscat, urmată de reducerea transmiterii luminii, prin cortexul superior deshidratat;

7) prezența unui număr redus de unități fotosintetice pe unitatea de suprafață sau de greutate (Smith, 1963).

Durata vieții este de ordinul mai multor ani, uneori sute sau chiar mii. În regiunile arctice alpine, speciile de *Rhizocarpon* și *Lecidea* au între 1000 și 4800 de ani.

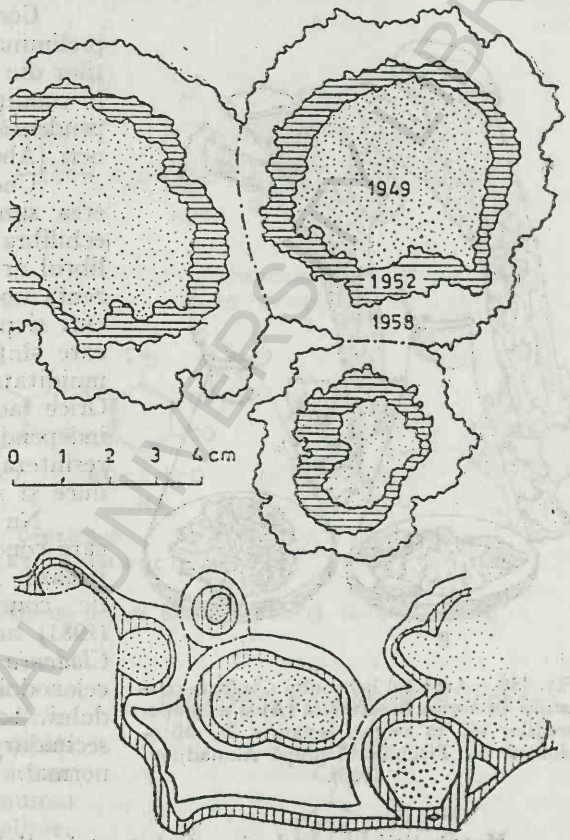



Fig. 145. — Dezvoltarea coloniilor lichenilor *Parmelia conspersa* (sus) și *Rinodina oreina* (jos). Conturul coloniilor a fost marcat pe folii de plastic în anii 1949, 1952 și 1958, și reprezentat grafic prin suprapunere (după Hale, 1961).

## Sinteza artificială a lichenilor în laborator

Cele mai multe tentative inițiale de reconstituire a simbiozei au eșuat ori s-au oprit în stadiile primare în care hifele fungice înconjurau algele pentru a forma mase celulare asemănătoare sorediilor. Ele au furnizat însă o serie de informații cu importanță fundamentală pentru înțelegerea biologiei lichenilor.

Pe medii agarizate conținînd substanțe organice, cei doi parteneri cresc independent unul de celălalt. În prezența unor concentrații minime de nutrienți sau în absența lor (pe medii cu agar pur) se observă un proces de „li-

chenizare", evidențiat prin încercuirea algelor de micobiont, pătrunderea lor de haustori fungici sau chiar apariția unui țesut pseudoparenchimatos prin dispunerea hifelor în jurul unui grup de alge. De altfel, după cum s-a demonstrat, în condițiile de aprovizionare limitată cu nutrienți, hifele încercuiesc orice obiect rotund cu dimensiuni adecvate (fig. 146).

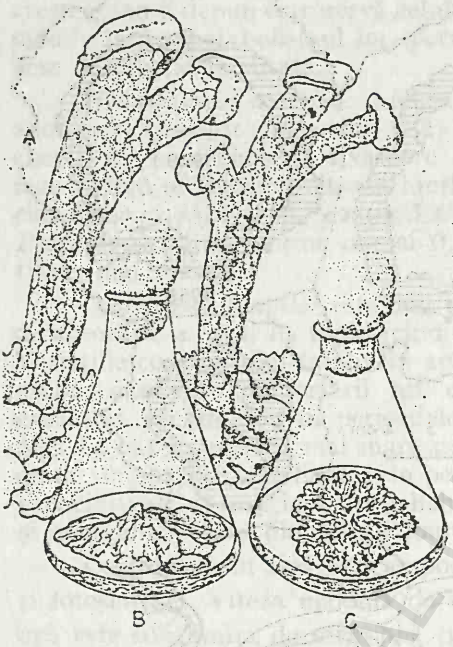



Fig. 146. — Aspectul lichenului *Cladonia cristatella* în forma sa naturală **(A)** și a componenților săi în culturi separate. **B.** Micobiontul. **C.** Ficobiontul (după Ahmadjian, 1967).

Concluzia acestor experimente preliminare este că asocierea simbionților din licheni nu are loc, niciodată, în condiții care permit creșterea independentă a unuia sau ambilor parteneri (Ahmadjian, 1973).

Unele date sugerează că asocierea simbionților depinde de creșterea echilibrată a algelor și a fungilor. Echilibrul ar fi menținut parțial de prezența unor substrate sărace în nutrienți și parțial de condițiile de mediu la care sînt expuși (alternanța uscăciune/umiditate, absența poluanților etc.). Orice factor care stimulează creșterea independentă a simbionților împiedică resinteza artificială a lichenilor, dar produce și separarea asociațiilor stabilite.

Nu se cunosc mecanismele prin care condițiile adverse de mediu favorizează „lichenizarea", dar ele par să fie complexe. Ahmadjian și colab. (1981) au reușit resinteza lichenului *Cladonia cristatella* asociind culturile celor doi parteneri, în prezența acidului barbatic (depsidă), metabolit secundar major produs de lichenul normal.

## Metaboliții secundari. „Substanțele lichenilor"

Faptul că lichenii reprezintă o nouă entitate biologică și nu simpla însumare a componenților lor este ilustrat și de capacitatea de a sintetiza o serie de metaboliți secundari specifici. Unii dintre ei sînt atît de caracteristici încît sînt reuniți sub denumirea de *„substanțele lichenilor"*. Ele sînt reprezentate de peste 220 de compuși organici extracelulari, cristalizabili, acoperind suprafața peretelui celular al hifelor, heterogeni din punct de vedere chimic, insolubili în apă, dar solubili în solvenți organici. Pot reprezenta între 1 și 8% din greutatea uscată a talului, iar în cazuri extreme pînă la 30%.

Substanțele lichenilor aparțin mai multor clase structurale (Srere și Mosbach, 1974), cele mai importante fiind:

1) *polichetide aromatice:* depside, depsidone, depsone, dibenzofurani, dibenzochinone, xantone, cromone, antrine, antrachinone, naftochinone;

2) *acizi graşi superiori şi lactone;*

3) *derivaţi ai mevalonatului:* diterpene, triterpene, acid leucotilic, acid flebic etc.;

4) *grupul shikimat:* dicetopiperazine, terpenilchinone, derivaţii acidului pulvinic etc.

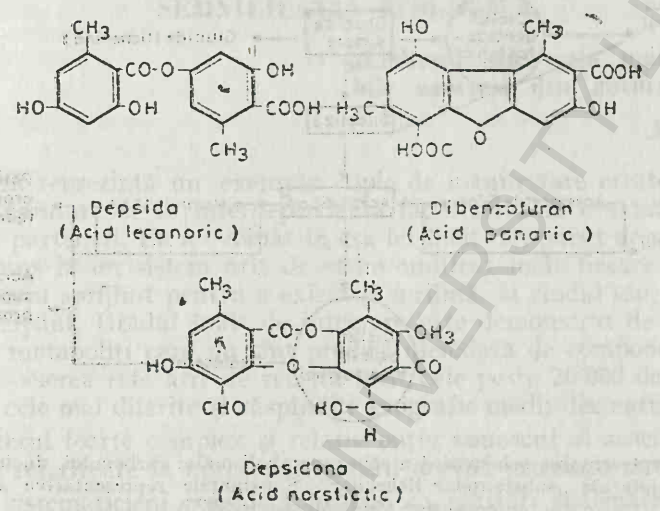



Fig. 147. — Substanţe sintetizate de licheni (după Galun şi Bubrick, 1984).

Peretele celular al hifelor conţine, în principal, polizaharidele *lichenină* şi *izolichenină*, şi în cantităţi mai mici pustulan şi alţi glucani, dintre care unii sînt prezenţi numai la licheni. Lichenina este un polimer linear de β-D-glucopiranoză, conţinînd legături glicozidice β-(1→3) şi β-(1→) în proporţie de 27:73. Are g.m. de 20—40 kdal. Unele din aceste substanţe (depside, depsine, depsidone, dibenzofuran şi derivaţii acidului pulvinic etc.) sînt întîlnite în natură numai la licheni (fig. 147).

Mosbach (1973) a demonstrat că sinteza lor are loc în cursul metabolismului glucidic (fig. 148). În cele mai multe cazuri, unitatea structurală principală este constituită din acidul orselinic şi omologii săi. Sinteza utilizează două mecanisme fundamentale: esterificarea pentru for-

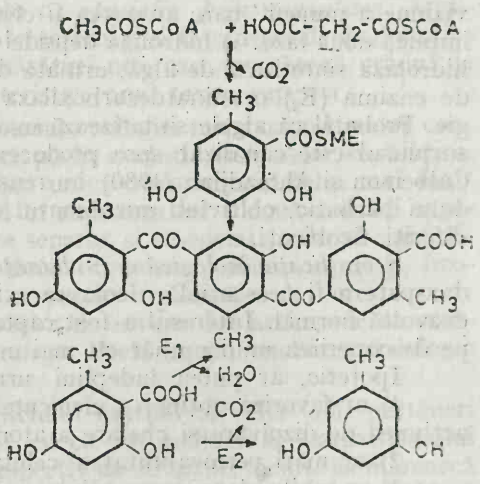



Fig. 148. — Biosinteza şi degradarea enzimatică a acidului giroforic produs de licheni: ME = complex multienzimatic; $E_1$ = orselinat depsid-hidrolaza; $E_2$ = orselinat decarboxilaza (după Srere şi Mosbach, 1974).

marea depsidelor și cuplarea oxidativă pentru a forma dibenzofurani. Sinteza depsidonelor necesită participarea ambelor mecanisme. Nu se știe dacă sinteza și catabolismul acestor substanțe sînt realizate de enzimele celor doi parteneri sau numai ale unuia dintre ei. După Galun și Bubrick (1984), contribuția esențială ar aparține fungilor sau asocierii fungi — alge, niciodată exclusiv algelor.

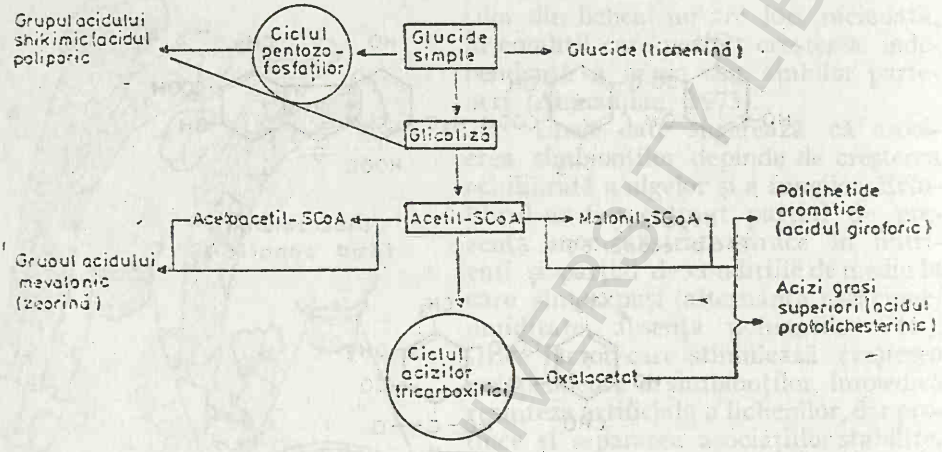



Fig. 149. — Reprezentarea schematică a căilor metabolismului carbonului, ducînd la formarea grupurilor majore ale „substanțelor lichenilor". Substanțele reprezentative sînt notate în paranteze (după Mosbach, 1973).

În catabolismul unui depsid, acidul giroforic, Srere și Mosbach (1974) au demonstrat co-participarea celor doi simbionți, printr-o adevărată „diviziune a muncii" care ar putea fi efectivă și în cazul sintezei (fig. 149). El implică două faze: 1) hidroliza depsidei de către enzima ($E_1$), orselinat depsidhidrolaza sintetizată de algă, urmată de etapa 2) de decarboxilare catalizată de enzima ($E_2$) orselinatdecarboxilaza provenită din compartimentul fungic. Probabil că algele sintetizează mai multe glucide decît le este necesar și surplusul este canalizat spre producerea de noi metaboliți. Relativ recent, Culberson și Ahmadjian (1980) au reușit sinteza experimentală *in vitro* a acidului barbatic, cultivînd micobiontul din *Cladonia cristatella*, în prezența a diferiți ficobionți.

*Semnificația biologică a „substanțelor lichenilor"* nu este încă cunoscută, dar pare a fi neesențială, deoarece există și licheni care nu le produc și se dezvoltă normal. Interesul a fost captat de marea lor diversitate și s-a axat pe descoperirea unui număr cît mai mare și pe stabilirea structurii chimice.

Ipotetic, ar putea îndeplini următoarele funcții:

1) ar favoriza obținerea elementelor metalice necesare din substrat prin acțiunea de dizolvare și chelare a atomilor de metal din substrat;

2) ar mări permeabilitatea celulară a simbionților algali;

3) ar inhiba degradarea talului sub acțiunea bacteriilor sau a unor fungi liberi.

**Antibioticele din licheni.** În ultimele două decenii au fost izolate din licheni o serie de substanțe cu acțiunea farmacodinamică complexă: antibiotică cu spectru larg, în special asupra bacteriilor Gram-pozitive și a micro-

fungilor, cu acțiune de accelerare a ritmului respirator la mamifere, de relaxare a mușchiului neted și cu efect adrenergic. Lista lor este lungă și include, între altele: acidul caperatic, acidul lichesterinic, zeorina, acidul usnic și derivații săi, acidul lecanoinic, sferoforina, acidul tamnolic, atranorina, acidul lobaric, diploicina, acidul salazinic, panarina, endocrocina, acidul fumarprotocetrarie etc. (Vartia, 1973).

## SEMNIFICAȚIA BIOLOGICĂ

**„Lichenii sînt cele mai remarcabile asocieri din natură..."**

M. E. Hale

Lichenii reprezintă un exemplu tipic de manifestare creatoare a simbiozei, de înaintare de la interdependența facultativă la cea totală a celor doi sau trei parteneri. Ea a evoluat în așa fel încît din punct de vedere fiziologic s-a ajuns la un sistem atît de strîns unificat încît fiecare participant este obligatoriu sprijinit pentru a exista și sprijină, la rîndul său, viața celuilalt coparticipant. Gradul înalt de integrare este demonstrat de apariția de structuri și metaboliți care nu sînt produși niciodată de componenții individuali, iar asocierea este atît de reușită încît cele peste 20 000 de specii sînt întîlnite în cele mai diferite și răspîndite geografic medii din natură.

Caracterul foarte complex și relativ puțin cunoscut al asocierii explică dificultățile referitoare la aprecierea naturii acestei simbioze integrate.

Mulți sistematicieni consideră lichenii ca entități sistematice independente, respectiv ca specii ale încrengăturii *Lichenophyta* (Pop și colab., 1983).

Botnariuc (1979) aderă la ideea că lichenii pot fi considerați ca un taxon nou, considerîndu-i ca un exemplu de *speciație prin mutualism*. Argumentul principal rezidă în faptul că interacțiunile și interdependența funcțională a celor doi simbionți determină trăsături noi, care marchează gradul de integrare complexă și profundă, caracteristice unui taxon superior.

Prin contrast, specialiștii în domeniul ecologiei microorganismelor consideră că lichenii nu au atins ultima etapă în evoluția sistemelor simbiotice, cea de unitate funcțională, de organism unic, corespunzînd celui mai înalt grad de integrare, datorită persistenței în structura lor a două entități organismice, care pot fi disociate, cultivate separat și reasociate natural sau artificial (experimental). Împreună, cele două organisme, micobiontul și ficobiontul, au ceva care nu au separat, respectiv capacitatea de a crește și de a se menține în condiții de mediu deosebit de severe. De aceea, ele se comportă mai degrabă ca un *simbiont ecologic* decît ca un simbiont fiziologic (Brock, 1966).

Unii autori insistă asupra beneficiului mutual al celor doi parteneri interpretînd chiar prezența haustorilor nu ca un indiciu al parazitismului ci ca un stadiu în evoluția lichenilor, respectiv ca structuri menite să mărească suprafața de contact între algă și fungi. În favoarea acestei opinii pledează faptul că numărul celulelor algale moarte este redus. Exceptînd puținele specii la care haustorii intracelulari sînt abundenți, simbioza lichenilor nu implică, în mod normal, digestia celulelor algale de către fungi.

În realitate, lichenii ca grup prezintă stadii de evoluție de la parazitism spre mutualism. În lichenii primitivi, fungii pătrund efectiv în celulele algale și sînt, în esență, paraziți pe acestea. La speciile mai evoluate, diferențiate, hifele fungice nu rup peretele celulei algale și trăiesc în armonie cu acestea, fie în contact strîns, fie întrețesînd filamentele algale, fără ca să pătrundă în interiorul lor. Ahmadjian (1982) se asociază acestui punct de vedere, considerînd lichenii ca un caz de parazitism controlat, în care algele au dezvoltat un anumit grad de rezistență la fungi. Ca urmare, numărul algelor omorîte este echilibrat de producerea de celule noi prin diviziune.

### Taxonomie

Contradicțiile privind semnificația biologică a simbiozei sînt reflectate și în poziția sistematică destul de contradictorie a lichenilor.

Unii specialiști consideră că nu pot fi considerați și clasificați ca o clasă sistematică cu statut de independență, ci numai ca un grup biologic. Numai simbionții individuali sînt entități ce pot beneficia de o recunoaștere taxonomică, putînd fi individualizați pe baza sistemelor de clasificare ale fungilor și respectiv ale algelor (Ahmadjian, 1965; Galun și Bubrick, 1984).

Prin contrast, alți cercetători consideră că asocierea simbiotică are o existență independentă datorită unicității structurale și caracterului fiziologic distinct. Ca urmare, este posibilă și chiar necesară considerarea lor ca organisme separate și clasificarea ca atare.

Botaniștii încadrează lichenii în încrengătura *Lichenophyta* (Pop și colab., 1983). Datorită rolului important al micobiontului în asociație (respectiv în formarea talului și altor particularități structurale) a existat tendința de a corela denumirea lichenilor cu cea a fungilor. Spre exemplu, lichenul *Cladonia cristatella* este compus din micobiontul *Cladonia cristatella* și alga *Trebouxia erici*.

Stanier, Adelberg și Doudoroff (1970) au evidențiat caracterul discutabil al acestei practici: 1) deși morfologia lichenilor este dominată de fungi, unele caractere variază în corelație cu natura partenerului algal; 2) este posibil ca mai multe „specii" diferite de licheni să conțină același micobiont și în aceste cazuri practica este fundamental greșită.

Poelt (1973) grupează cele 20 000 de „specii" de licheni în două grupe majore în funcție de natura fungilor din structura lor: 1) *Ascolichenes*, care cuprinde opt ordine distincte și 2) *Basidiolichenes*, cu două ordine. Se adaugă un grup minor de *licheni imperfecți*.

### Ecologie

Lichenii sînt prezenți practic în toate regiunile globului atît în cele cu condiții extreme (regiuni polare, tundră, deșert, regiuni cu climat cald), soluri sărace și aride, cît și în regiuni temperate, în condiții adecvate dezvoltării altor plante. Ei se dezvoltă pe sol (tericoli), pe scoarța copacilor (corticoli) sau pe stînci (saxicoli).

Atît inițierea, cît și menținerea simbiozei necesită condiții de mediu care nu favorizează dezvoltarea independentă a celor doi simbionți. Pot supraviețui timp îndelungat la temperaturi ridicate (53—69°C) și la uscăciune, iar în regiunile polare sute sau chiar mii de ani (Hale, 1973). Se dezvoltă în medii sărace în nutrienți, datorită mecanismelor eficiente de absorbție și

acumulare intracelulară, și utilizării lente a nutrienților. Colonizează habitate extrem de ostile cum ar fi suprafața netedă a stîncilor, atacîndu-le structura cu ajutorul acizilor organici produși. Datorită acestei particularități, lichenii, în special cei crustoși, sînt unele dintre cele mai importante organisme-pionier din natură prin capacitatea lor de a coloniza substrate în condiții în care nici un alt organism n-ar putea să o facă. După Emerson, fără ei, alte plante s-ar stabili greu sau niciodată în anumite locuri de pe Terra.

Asociația mutuală din licheni este, totuși, numai subtil echilibrată, deoarece poate fi relativ ușor perturbată de factori de mediu. Experimental, s-a demonstrat că după îndepărtarea din natură și transferul în condiții favorabile în laborator (umiditate mare, prezența substanțelor organice etc.), fungii proliferează distrugînd algele sau, după caz, algele se pot multiplica rapid copleșind fungii. Chiar dacă dezechilibrul este minor și viteza de creștere relativă a celor doi parteneri nu este fundamental modificată apar modificări profunde în contactul celular ficobiont micobiont.

Acest mecanism explică marea sensibilitate a lichenilor la poluanți. Ei au dispărut practic din unele zone industrializate pentru că sînt foarte sensibili la $SO_2$ din atmosferă, care influențează brutal încorporarea $^{14}C$ în fotosinteză (fig. 150). Eficiența redusă a fotosintezei algale în condiții de poluare permite o dezvoltare exagerată a fungilor și eliminarea asociației:

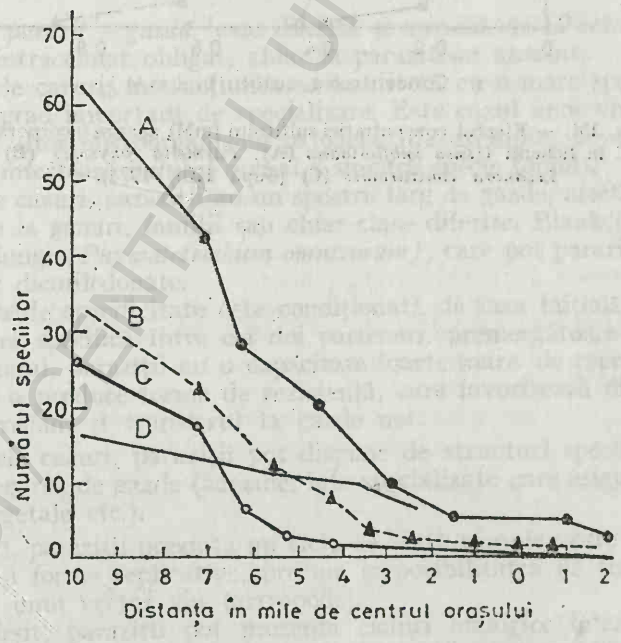



Fig. 150. — Reprezentarea schematică a diminuării numărului speciilor de licheni pe măsura apropierii de zona din vest a orașului Newcastle : A = numărul global ; B, C, D = numărul speciilor dezvoltate pe diferite substraturi caracteristice (după Gilbert, 1965).

după distrugerea algelor, fungii nu pot supraviețui în stare liberă în habitat și sînt eliminați. Marea sensibilitate a lichenilor la poluanți — pentru care reprezintă un indicator fin — (fig. 151) se explică prin capacitatea lor de a absorbi eficient diferite substanțe chimice aflate în apa de ploaie, chiar în soluții foarte diluate, și incapacității de a le excreta. În felul acesta, ele ajung ușor la concentrații toxice intracelulare.

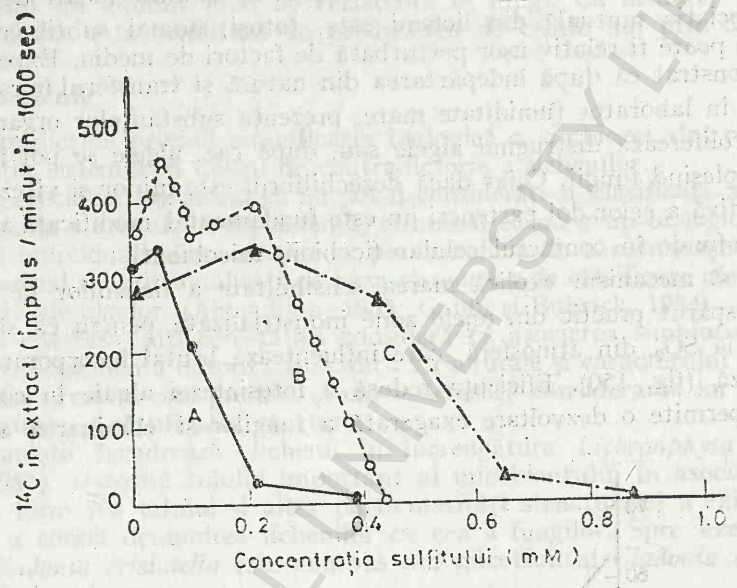



Fig. 151. — Efectul concentrației sulfitului (mM) asupra încorporării $^{14}C$ în lichenii *Usnea subfloridana* **(A)**, *Parmelia physodes* **(B)** și *Lecanora conizaeoides* **(C)** (după Hill, 1971).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# PARAZITISMUL

**„Paraziții, ca grup, desfășoară o gamă largă și ingenioasă de strategii pentru a determina organismul-gazdă să se supună propriilor lor nevoi"**

R. LEVINE

Parazitismul corespunde relației în care un organism se hrănește cu celulele, țesuturile sau lichidele corpului altui organism viu, care poate suferi prejudicii, mai mult sau mai puțin severe. Relația parazit—gazdă este, în general, de relativ lungă durată.

Spre deosebire de prădător, care omoară prada rapid, pentru a se hrăni cu constituenții ei, paraziții lasă gazda vie, asigurînd o conviețuire îndelungată, la capătul căreia îi pot determina uneori moartea, de multe ori după ce s-au multiplicat.

Paraziții sînt organisme mai mici, mai puțin viguroase decît gazda.

Pot acționa ca paraziți, în afară de virusuri, bacteriile, fungii și protozoarele. Practic, nici un grup major de organisme nu este apărat de paraziți.

*Relația parazit — gazdă* este diferită și variază de la ectoparazitism la parazitism intracelular obligat, chiar la parazitism absolut.

În unele cazuri, interacțiunea se manifestă cu o mare specificitate, reflectînd un grad important de specializare. Este cazul unor virusuri *(Poliovirus)* și al altor microorganisme patogene (de exemplu, *Mycobacterium leprae)*, care infectează *natural* numai o singură specie (omul).

În alte cazuri, paraziții au un spectru larg de gazde, afectînd organisme care aparțin la genuri, familii sau chiar clase diferite. Blank (1953) citează cazul unor fungi *(Phymatotrichum omnivorum)*, care pot parazita peste 2000 de specii de dicotiledonate.

Relația de specificitate este condiționată de faza inițială de recunoaștere și legare specifică între cei doi parteneri, premergătoare infecției.

În general, paraziții au o capacitate foarte mare de reproducere, posibilitatea de a produce forme de rezistență, care favorizează diseminarea lor eficientă, precum și transferul la gazde noi.

În unele cazuri, paraziții pot dispune de structuri specifice menite să le asigure legarea de gazde (adezine, hife specializate care asigură străbaterea celulelor vegetale etc.).

Alteori, paraziții prezintă un ciclu de viață complex care include forme infecțioase și forme replicative, precum și posibilitatea de transmitere prin intermediul unui vector viu (artropode).

În sfîrșit, paraziții pot prezenta cicluri biologice interconectate: un exemplu tipic este furnizat de bacteria *Legionella pneumophila*, care în mediul acvatic (lacuri, pîraie, surse de apă orășenești) infectează protozoarele. Pe calea aerosolilor, poate infecta omul, producînd adesea o pneumonie letală (boala „legionarilor") sau forme ușoare nepneumonice (boala Pontiac).

*Virulența* paraziților este variabilă chiar în cazul aceleiași specii, de la cvasiinofensiv la parazitism activ și chiar letal. Evoluția parazitismului este rezultatul interacțiunii dintre virulența parazitului și intensitatea reacțiilor de apărare (structurale, metabolice, imunitare) ale gazdei.

## PARAZITISMUL INTRACELULAR

**„Problema de bază a parazitismului intracelular este una dintre problemele fundamentale ale întregii biologii: reacția organismului la mediul său"**

J. W. MOULDER

Realizarea parazitismului intracelular necesită îndeplinirea următoarelor condiții:

1) pătrunderea parazitului în celula-gazdă;

2) capacitatea lui de a supraviețui și de a nu perturba funcții esențiale ale acesteia;

3) multiplicarea intracelulară;

4) eliberarea din celulă;

5) supraviețuirea în cursul transferului la alte celule sau la alte organisme-gazdă.

**Celula-gazdă ca mediu extrem.** Moulder (1974, 1979) consideră că sistemul parazit intracelular/celula-gazdă prezintă multe particularități descrise de ecologi ca fiind caracteristice mediilor extreme (izvoare termale, zăpezi veșnice, lacuri hipersaline, soluri deșertice etc.) și speciilor dominante care le populează.

Sintetic, aceste particularități se referă la:

1) diversitatea foarte limitată a speciilor prezente (uneori una singură) (tabelul nr. 25);

2) speciile dominante au dobîndit caractere adaptative, absente la organismele din același grup care trăiesc liber;

3) prin aceste adaptări, speciile dominante devin adesea obligatoriu dependente de prezența factorilor care limitează diversitatea lor (temperaturi extreme, hipersalinitate, uscăciune etc.);

4) factorul limitant este abiotic.

*Tabelul nr. 25*

**Exemple de specii dominante în cîteva medii extreme**
(după Moulder, 1974)

| Mediul | Specia tipic dominantă |
|---|---|
| Izvoare termale | Cianobacterie (*Synechococcus*) |
| Zăpezi eterne | Alge |
| Mediul hipersalin (Great Salt Lake) | *Uroleptus* (Ciliat) |
| Sol de deșert | *Bacillus* |

Deși interacțiunile din sistemul parazit intracelular și gazdă sînt extrem de complexe este evident că ele îndeplinesc primele trei condiții, ceea ce permite să se considere celula-gazdă vie ca un mediu extrem, iar parazitul ca specie dominantă, respectiv unică a habitatului. Factorul limitant este însă biotic și multe din activitățile sale ca nișă ecologică implică interacțiuni dintre cele mai diverse, foarte multe încă necunoscute. Oricum, este evident că habitatul intracelular nu este un mediu ideal, ci, uneori, chiar ostil.

Parazitul competiționează cu gazda pentru intermediari de biosinteză, în așa fel încît își poate lua nutrienții specifici uneori cu mare dificultate. În plus, este probabil că unii nutrienți importanți și factori de creștere nu se găsesc totdeauna în forme și concentrații optime.

Așa cum toate organismele își modifică mediul în care trăiesc, paraziții intracelulari nu fac excepție: ei sînt obligați fie să dobîndească proprietăți care le permit să supraviețuiască și chiar să se multiplice în prezența factorilor limitanți, fie să modifice mediul intracelular pentru a-l neutraliza (Moulder, 1985). În cazuri extreme, parazitul poate determina moartea celulei-gazdă.

Cel mai adesea însă, relațiile parazit/celulă evoluează spre o stare de echilibru datorită tendinței de reglare a vitezei de multiplicare a parazitului în așa fel încît să nu depășească limitele tolerate de către gazdă. În general, relațiile dintre parazit și celula-gazdă evoluează spre o stare de toleranță, caracterizată printr-o infecție prelungită, cu leziuni minime. Acest fapt este reflectat și de faptul că paraziții intracelulari nu se înmulțesc foarte repede — contrar presupunerilor, deși conținutul celular este bogat în nutrienți: la *Chlamydia* sp., durata unei generații este de 2—3 ore, iar la *Rickettsia* de 7—8 ore.

În același timp, paraziții afectează sinteza moleculelor specifice celulare (acizii nucleici, proteine), frecvent proporțional cu numărul lor, respectiv cu multiplicitatea infecției. În cazul infecției cu o singură celulă de *Chlamydia*, efectul este tardiv, celula-gazdă suferă mai multe cicluri de diviziune înainte de a fi distrusă. Infecțiile masive (50 — >50 celule de *Chlamydia*) sînt urmate de inhibarea sintezei acizilor nucleici și a proteinelor în 12—18 ore (tabelul nr. 26).

## TIPURILE DE PARAZITISM INTRACELULAR

*Parazitismul facultativ intracelular* este tipic în cazul microorganismelor cu exigențe nutritive relativ moderate, care le conferă posibilitatea de a se dezvolta și pe medii lipsite de celule vii. Ele s-au adaptat la viața intracelulară, fără a-și pierde capacitatea de a crește extracelular. Este cazul unei bacterii ca *Mycobacterium tuberculosis*, care se poate dezvolta pe anumite medii cu substanțe organice complexe, dar și pe medii sintetice suplimentate cu aminoacizi, biotină, $NH_4^+$ și glicerol. În mod asemănător, *Shigella flexneri* se poate dezvolta pe medii sintetice, la care se adaugă glucoză, aspartat, acid nicotinic, tiamină și săruri minerale.

*Parazitismul obligat intracelular* este caracteristic microorganismelor limitate obligatoriu la viața intracelulară. Ele și-au pierdut caracterele esențiale care le asigurau existența extracelulară sau au dobîndit unele proprietăți care o fac imposibilă. Nu este exclusă intervenția ambelor mecanisme.

*Tabelul nr. 26*

**Principalele particularităţi ale unor microorganisme parazite intracelular**
(după Moulder, 1985)

| Particularităţile de dezvoltare | Bacterii | | | | Protozoare |
|---|---|---|---|---|---|
| | *Bdellovibrio* sp. | *Coxiella* sp. | *Rickettsia* sp. | *Chlamydia* sp. | *Plasmodium* sp. |
| Gazdele experimentale | Bacterii Gram-negative, obişnuit *Escherichia coli* | Embrionul de găină; liniile celulare L şi Vero. | Embrionul de găină; linia celulară L | Embrionul de găină; liniile celulare L şi Hela. | Eritrocitele păsărilor sau mamiferelor infectate; eritrocite cultivate *in vitro* |
| Locul multiplicării | Spaţiul periplasmatic | Fagolizosom | Libere în citoplasmă | Vacuolă citoplasmatică | Vacuolă citoplasmatică |
| Modul de multiplicare | Fragmentarea formei filamentoase | Diviziune simplă | Diviziune simplă | Diviziune simplă | Segmentarea formelor multinucleate |
| Numărul unităţilor infecţioase noi per celulă-gazdă | 4 — 20 | Pînă la 1000 | 100 — 1000 | 10 — 1000 | 6 — 20 |
| Durata ciclului | 4 ore | Cîteva zile | 3 — 5 zile | 2 — 3 zile | 1 — 3 zile |
| Lezarea celulei-gazdă | Imediată şi letală | Modificări minime | După multiplicare intensă imediată şi letală | După multiplicare intensă, imediată şi letală; la multiplicare lentă, celula-gazdă continuă să se multiplice | Alterarea membranei eritrocitare; degradarea hemoglobinei; celula-gazdă nu permite multiplicarea |

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Sursa de energie | ATP (oxidarea aerobă a aminoacizilor eliberați din proteinele degradate) | ATP (oxidarea aerobă a glutamatului și glucozei) | ATP (oxidarea glutamatului) Absența catabolismului glucozei ; transportul și utilizarea ATP exogen limitate | Nu produce ATP din substrate exogene pentru sinteza macromoleculelor | ATP din fosforilare la nivelul substratului, însoțită de glicoliză. Utilizează limitat ATP exogen ; oxidare aerobă discutabilă |
| Sinteză independentă a macromoleculelor | Da. Sintetizează ADN, ARN și proteine în celulele-gazdă omorîte termic | Da. Sintetizează ADN, ARN și proteine independent de celula-gazdă | Da. Sintetizează ADN, ARN și proteine independent de celula-gazdă normală sau tratată cu cicloheximidă *). | Da. Sintetizează ADN, ARN și proteine independent de celula-gazdă normală sau tratată cu cicloheximidă | Da. Sintetizează ADN, ARN și proteine. Încorporează izotopi prin creștere limitată |
| Nivelul de fosforilare la care nucleozidele celulei-gazdă sînt incorporate în acizi nucleici | Monofosfați proveniți din degradarea ADN și ARN/gazdă | Probabil mono- și difosfat din rezerva gazdei | În principal, monofosfat din rezerva gazdei | Trifosfați din rezerva gazdei | Necunoscut. Încorporează în acizi nucleici nucleozide purinice din rezerva gazdei |
| Particularități speciale | Gazdă procariotă (altă bacterie) | Ciclu de dezvoltare cu celule de tip vegetativ și celule similare endosporilor | Ciclu de dezvoltare nedemonstrat | Ciclu de dezvoltare cu tipuri celulare infecțioase și reproductive | Parazit eucariot. Studiile metabolice limitate la un singur stadiu al ciclului de viață (stadiul eritrocitar) |

*) Cicloheximida inhibă sinteza ADN și a proteinelor în celulele eucariote.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# PĂTRUNDEREA MICROORGANISMELOR PARAZITE ÎN CELULELE-GAZDĂ

**„Pătrunderea în celulele-gazdă este o strategie utilizată de numeroși patogeni".**

J. W. MOULDER

Înglobarea bacteriilor patogene în celulele parazitate are, cel mai adesea, un grad important de selectivitate. Acest fenomen este determinat de faptul că înglobarea este precedată de legarea prealabilă de celula-gazdă prin fenomene de recunoaștere bilaterală pe baza interacțiunii unor structuri complementare.

Originea receptorilor de paraziți este necunoscută. Este probabil că la baza apariției și funcționării lor ar interveni procese de tipul celor descrise de Jacob (1977) sub denumirea de „bricolaj molecular" („Molecular thinkering"; engl. to thinker = a lucra ca amator), respectiv de utilizare a unor structuri aflate de-a gata pentru întrebuințări noi. Ele presupun că receptorii actuali ai paraziților au apărut cu altă funcție la un parazit ancestral extracelular pentru ca, ulterior, să-i confere acestuia un avantaj semnificativ la supraviețuire pentru intrarea în celula-gazdă, după ce a interacționat cu structuri similare ale acesteia. La rîndul lor, receptorii celulelor-gazdă au evoluat pentru a îndeplini funcții complet independente de interacțiunea cu paraziții, dar au fost „deturnați" de la funcția lor normală, fiziologică.

Au fost descrise două mecanisme principale de pătrundere a paraziților în celulele-gazdă (Moulder, 1985):

I. **Endocitoza** reprezintă mecanismul cel mai frecvent și corespunde situației în care parazitismul distruge continuitatea structurală a învelișurilor celulei-gazdă și intră înconjurat de o membrană derivată din cea a gazdei.

În funcție de contribuția relativă a celor doi parteneri au fost descrise două tipuri:

A. *Endocitoza dependentă (dirijată) de parazit* („Parasite-directed (specified) endocytosis") corespunde cazului în care înglobarea este facilitată de adaptări structurale și/sau funcționale ale parazitului. Această formă de endocitoză se realizează în două variante:

1) Prima corespunde situației în care parazitul dispune de organite specializate de legare și/sau intrare. Înglobarea este dependentă de consumul de energie de către parazit.

Mecanismul este tipic pentru interacțiunea dintre *Plasmodium* sp. și hematiile vertebratelor, celulele cele mai limitate metabolic și puțin competente pentru fagocitoză. Experimental, s-a demonstrat că după recunoașterea realizată prin receptorii prezenți pe suprafața celor doi parteneri, merozoizii aderă de hematii cu ajutorul unui înveliș celular gros format în cursul schizogoniei (respectiv prin filamentele unei glicoproteine acide, cu dimensiunea 94 × 20 nm), care înconjură merozoitul. Invazia are loc numai cînd acesta se leagă de hematie prin *complexul apical*, structură formată din inele polare interconectate cu veziculele secretoare (rhoptrii și microneme). În

acest caz are loc o îndoire spasmodică a hematiei în jurul merozoitului, cu invaginarea membranei celulare, în timp ce merozoitul se deplasează cu o mișcare de rotație în cavitatea rezultată. Final, membrana pliată fuzionează înapoia parazitului, introducîndu-l astfel în celula-gazdă. Membrana hematiei nu este nici un moment ruptă, ci doar modificată prin pierderea unor proteine membranare și apariția unor canale ce permit accesul spre citoplasmă.

2) Al doilea tip de endocitoză facilitată de parazit corespunde situației în care acesta nu dispune de organite specializate de legare și/sau pătrundere în celulă. Este întîlnit în două variante:

a) Prima variantă a fost descrisă în cazul tulpinilor virulente de *Shigella flexneri*. Virulența este condiționată de sinteza unui lipopolizaharid cu structură particulară și de prezența unei megaplasmide (g.m. 140 megadal). Celulele lipsite de plasmide sînt avirulente. Sînt înglobate numai bacteriile metabolic active.

Procesul *necesită consum de energie* și participarea microfilamentelor intracelulare ale epiteliului intestinal. Bacteriile sînt înglobate într-o vezicule derivată din membrana celulei-gazdă. Eliberarea lor de vezicula de endocitoză esențială pentru evoluția infecției este mediată de produsul unei gene din structura unei plasmide de virulență, numită hemolizina de contact *, care degradează în ~ 15 minute membrana veziculei.

b) A doua variantă, descrisă la *Chlamydia psittaci* și *C. trachomatis*, se realizează cu mare ușurință și fără consum de energie. Pot fi internalizate și celulele metabolic inactive (iradiate cu UV sau cu metabolismul celular blocat cu antibiotice). Mecanismul exact nu este cunoscut. Ușurința cu care se realizează internalizarea a sugerat unor autori intervenția unui mecanism de tip „fermoar" („Zipper-like mechanism"), ca în fagocitoza imună sau de tipul endocitozei mediate de receptori** (Ward și Murray, 1984).

B. *Endocitoza dependentă de gazdă* este caracteristică după Moulder (1985) pătrunderii tripomastigoților și epimastigoților de la *Trypanosoma cruzi*, în special în macrofage. Endocitoza se încadrează în funcția normală a celulelor gazdei, detaliile privind natura receptorilor sau altor structuri de suprafață (fibronectine etc.) fiind încă necunoscute.

II. **Diacitoza** (gr. dia = prin, de partea cealaltă). Mecanism particular, descris de Moulder (1985), corespunde situației în care parazitul perforează învelișurile externe ale celulelor-gazdă, producînd o „gaură", prin care intră în aceasta, fără a fi inclus într-o membrană derivată din gazdă.

Mecanismul este descris ca tipic la *Bdellovibrio* sp. care intră prin peretele perforat al bacteriei-gazdă propulsat de flagel. Ulterior, peretele celular este reparat, prin formarea unei cicatrice, iar membrana citoplasmatică a bacteriei-gazdă se îndepărtează de peretele celular. În felul acesta, *Bdellovibrio* nu este un parazit intracelular tipic, deoarece el rămîne în compartimentul intramural și nu intracitoplasmatic.

**Supraviețuirea în celulele-gazdă**, una din calitățile esențiale pentru realizarea parazitismului intracelular, are la bază mai multe strategii, ale căror mecanisme sînt incomplet elucidate (Moulder, 1985). Acestea se referă

---

* Denumire incorectă, cu caracter limitativ, bazată pe efectul hemolitic consecutiv contactului direct cu hematiile *in vitro*.

** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, p. 198.

la evitarea mecanismelor intracelulare și în special pe acțiunea enzimelor lizosomale*:

1) **Infectarea unei celule-gazdă fără lizosomi,** așa cum este eritrocitul matur nenucleat, este întîlnită în cazul unor bacterii ca *Bartonella* sp. (care produce infecții ale animalelor domestice și sălbatice) și la unele protozoare ca *Plasmodium* sp. și hemosporidii. Majoritatea paraziților din această categorie trăiesc în anumite etape ale ciclului lor de viață în alte celule, care conțin lizosomi sau provin din ancestori, care au trăit inițial în celule neeritrocitare.

2) **„Evadarea" din fagosomi,** la puțin timp după pătrunderea în celule, a fost descrisă inițial la *Rickettsia mooseri* și apoi la *R. tsutsugamushi* care părăsesc fagosomul după 30 minute de la infecție. Un rol esențial în acest proces ar avea fosfolipaza A, care atacă membrana fagosomală.

În mod asemănător, tripomastigoții de *Trypanosoma cruzi* părăsesc fagosomii după o oră de la infecție pentru a se multiplica în citoplasmă în următoarele 48 de ore.

3) **Împiedicarea fuziunii fagolizosomale** este un mecanism mai comun, întîlnit la *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia*, *Legionella pneumophila*, *Toxoplasma gondii* etc., dar avînd baze moleculare diferite. Astfel, la *M. tuberculosis*, blocarea fuziunii are la bază intervenția unor produși asociați cu virulența (sulfatide, glicolipide anionice cu trehaloză), care, acționînd asupra membranelor lizosomale, le face nefuzionabile. *M. microti* împiedică fuziunea fagosom/lizosom prin creșterea concentrației intracelulare a AMP, iar *C. pittaci* modifică structura membranei fagosomului în care este conținută.

4) **Rezistența la acțiunea enzimelor lizosomale** este întîlnită la *Coxiella burnetii*, care, printr-un mecanism necunoscut, este adaptată să se multiplice în mediul acid (pH 5,0) și să reziste la acțiunea enzimelor lizosomale. În ceea ce privește *Leishmania donovani* au fost incriminate mai multe mecanisme ca: 1) existența unei suprafețe celulare, rezistentă la enzime; 2) eliberarea de către parazit a unor inhibitori sau inactivatori enzimatici; 3) producerea de $NH_3$ în fagolizosom, cu creșterea valorii pH și inactivarea enzimelor lizosomale active în mediu acid (Moulder, 1985).

## MULTIPLICAREA PARAZIȚILOR INTRACELULARI

Fenomenul a fost studiat în special în cazul bacteriilor patogene pentru om și animale. Mecanisme subtile, încă puțin descifrate, reglează debutul și sfîrșitul multiplicării. Relația este perfect reglată în sensul că viteza de multiplicare este adaptată la condițiile de mediu intracelular (nutrienți, metaboliți intermediari, sursa de energie etc.).

Cu excepția rickettsiilor, care se multiplică direct în citoplasmă *(Rickettsia prowazekii, R. tsutsugamushi)* sau în nucleu *(R. rickettsii)*, celelalte bacterii parazite rămîn segregate în vacuole delimitate de o membrană vacuolară derivată din celula-gazdă.

*Coxiella burnetii* se multiplică prin diviziune simplă, în vacuole enorme, pline cu citoplasmă, avînd proprietățile fagolizosomilor. Aceste vacuole pot conține pînă la 1000 de celule rezultate din diviziune. Parazitul poate persista mai mulți ani, fără a fi distrus de celula-gazdă (Combiescu și Zarnea, 1958).

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, p. 212.

În mod asemănător, *Chlamydia psittaci* se multiplică în vacuole delimitate de membrane, ce pot conține 10—100 de elemente noi. În general, în cursul multiplicării bacteriilor, vacuolele se măresc de 10—100 de ori ca masă și suprafață, modificîndu-și, în același timp, prin mecanisme necunoscute, atît structura originară (numărul, natura și distribuția proteinelor membranare), cît și proprietățile funcționale.

## ELIBERAREA PARAZIȚILOR INTRACELULARI

Chiar în cazurile în care echilibrul parazit/gazdă este fin adaptat, celula-gazdă suferă modificări mai mult sau mai puțin importante, care permit eliberarea parazitului în mediu și posibilitatea acestuia de a infecta celule noi. Acest fenomen reprezintă o condiție esențială a persistenței lui în natură.

El se realizează, cu anumite particularități specifice diferiților paraziți, prin trei mecanisme fundamentale:

1) eliminarea bruscă, rezultată prin ruperea membranei celulare, ca rezultat al șocului mecanic sau osmotic, consecință a multiplicării nerestrictive a parazitului;

2) producerea de enzime litice, care afectează integritatea membranelor celulare;

3) eliberarea lentă și continuă din celule cu membrane hiperpermeabile, datorită infecției.

Astfel, studiile efectuate cu *Chlamydia psittaci* au demonstrat că eliberarea se poate realiza fie prin ruperea bruscă a celulelor suprainfectate, care își golesc conținutul în mediu, fie ca rezultat al sintezei unor proteinaze noi cu rol în modificarea membranei celulare. În unele cazuri se pot elibera celule întregi infectate sau mici grupuri de chlamidii, incluse în fragmente de citoplasmă celulară.

Rickettsiile ilustrează, de asemenea, variante ale modalităților de eliberare descrise.

*Rickettsia prowazekii* este eliberată brusc, prin distrugerea celulelor-gazdă supraîncărcate cu paraziți (după 72—96 de ore de la infecție). Fenomenul este condiționat, pe de o parte, de acumularea unui număr critic de ricketsii și, pe de alta, de intervenția fosfolipazei A (implicată și în infectarea celulei-gazdă), care acționează asupra membranei plasmatice a acesteia.

*R. rickettsii* este eliberată numai în fazele tardive ale infecției, ca rezultat al pierderii integrității funcționale a membranei celulare și a acțiunii fosfolipazei A.

În sfîrșit, *R. tsutsugamushi* este eliberată prin apariția de evaginări ale membranei celulare, ca niște proiecții, uneori pedunculate, care se desprind de celula-gazdă. Rickettsiile înconjurate de membrana celulară, ca într-o vacuolă, sînt infectante pentru alte celule normale. Cele libere nu mai pot fi transmise în continuare.

**Eliberarea incompletă.** În multe cazuri, după cum au demonstrat studiile pe culturi celulare, eliberarea paraziților este incompletă. Aproximativ jumătate din unitățile infecțioase rezultate din multiplicare rămîn asociate cu celulele-gazdă sau inclavate în resturi celulare din care nu pot fi disociate decît cu mare dificultate.

*Semnificația* acestui fenomen este necunoscută. El ar putea reflecta, după Moulder (1985), fie o imperfecțiune a infecțiilor naturale, fie o modalitate de a limita transmiterea naturală a bolilor.

## APARIȚIA PARAZITISMULUI INTRACELULAR

Paraziții intracelulari provin din ancestori extracelulari adaptați la viața în anumite celule-gazdă. O probă în acest sens o constituie persistența și în prezent a unor grupuri de microorganisme extracelulare foarte înrudite. Astfel, *Rochalimaea (Rickettsia) quintana*, agentul patogen al „febrei de tranșee" (febra de Wolhynia), poate fi cultivată în laborator pe medii neanimate și se dezvoltă masiv pe suprafața celulelor eucariote. Ea păstrează unele înrudiri evidente cu *Rickettsia prowazekii*, parazit obligat intracelular (agentul patogen al tifosului exantematic), ca, de exemplu, morfologia, hibridarea ADN/ADN~25—33%, capacitatea de catabolizare a glutamatului etc.

Tranziția de la modul de viață extracelular la cel obligat intracelular reprezintă efectiv un mare salt evolutiv. Pentru a explica modul în care s-a realizat au fost propuse două ipoteze, care nu sînt mutual exclusive.

### Ipoteza tranziției rapide, printr-un mare salt evolutiv

La baza acestui mecanism ar sta, după Ford (1976), existența anumitor situații care stimulează evoluția rapidă și adaptarea la un habitat nou, deosebit, în care, dacă specia respectivă supraviețuiește, puterea selecției acționează pentru a stimula modificări corespunzătoare noului mediu.

De altfel, Jablonsky și colab. (1983), pe baza unor observații și a unor considerații teoretice, admit că mediile naturale sărace în specii expuse unor condiții de stress ar favoriza inovațiile evolutive și poate chiar posibilitatea unor mari salturi evolutive.

Cu toate acestea, cei mai mulți cercetători sînt sceptici față de această posibilitate, deoarece caracterul discontinuu al tranziției de la extracelular la intracelular este de cele mai multe ori doar aparent. Există o singură probă experimentală în favoarea acestui mod de tranziție, furnizată de Jeon (1983): o bacterie Gram-negativă (probabil *Enterobacteriaceae)*, care în decursul a numai 200 de generații a trecut de la stadiul de patogen letal pentru *Amoeba proteus* la component celular perfect tolerat de celula-gazdă.

Evident, în cazul bacteriilor, existența plasmidelor de virulență și a transpozonilor ce includ gene de virulență poate favoriza unele transformări evolutive majore, prin interschimbul frecvent de material genetic și prin funcția fundamentală a plasmidelor de mărire a repertoriului genetic bacterian și de adaptare la medii insolite.

### Ipoteza tranziției treptate (lente)

Această ipoteză are la bază ideea că evoluția spre parazitismul intracelular este rezultatul acumulării unui număr de adaptări independente apărute succesiv.

Ipoteza se bazează și pe unele fapte de observație actuale.

Astfel, Smith (1979), precum și Moulder (1974, 1985) citează cazul relațiilor simbiotice dintre alge și organismele-gazdă care sugerează existența unor trepte succesive de tranziție de la extra- la intracelular:

1) algele sînt efectiv extracelulare față de fungi în cazul lichenilor;

2) relația este mai intimă, dar nu intracelulară în simbioza algelor cu unele nevertebrate și

3) este complet intracelulară în simbioza *Chlorella* /*Hydra*.

Diferite mecanisme adiționale pot favoriza tranziția treptată spre parazitismul intracelular:

1) Existența unor preadaptări apărute în cursul vieții extracelulare ar putea asigura un anumit avantaj biologic, reprezentînd o fază preliminară stadiului intracelular. Între acestea, adeziunea specifică, selectivă, a unor bacterii patogene de anumite celule ar putea favoriza endocitoza și implantarea lor stabilă în celulele respective.

2) Există, de asemenea, posibilitatea ca un parazit extracelular să devină intracelular, inițial cu prețul unor adaptări minime, urmate de o evoluție și o perfecționare a acestor adaptări în celula-gazdă. În spiritul acestei ipoteze, strămoșii paraziților actuali ar fi fost mai puțin adaptați și ar fi fost înlocuiți în timp de organisme tot mai perfecționate.

Evoluția infecției cu *Neisseria gonorrhoeae* ar putea ilustra, după Moulder (1985), acest punct de vedere. Această bacterie se leagă inițial de microvilii celulelor epiteliale columnare ale mucoasei uretrale. Ulterior se leagă ferm de celulele epiteliale cu suprafață mare, se multiplică extensiv pe suprafața celulelor-gazdă și, în final, un număr relativ mic de bacterii pătrund în celulele epiteliale (nefagocitare) printr-un mecanism tipic de endocitoză. Ele rămîn temporar în aceste celule, incluse în vacuolele de endocitoză, fără a fuziona cu lizosomii. Final, în această stare, migrează spre regiunea bazală a celulelor-gazdă și sînt eliberate fie prin extruzia vacuolei, ca un întreg, fie prin liza celulei. Există și posibilitatea difuziei laterale a infecției în țesutul conjunctiv subepitelial.

## EVOLUȚIA PARAZITISMULUI INTRACELULAR LA BACTERII

Parazitismul intracelular este rezultatul unei adaptări subtile și complexe la mediul extrem, reprezentat de celula-gazdă, asociată cu pierderea versatilității metabolismului bacterian, și, în mod specific, cu pierderea capacității de a trăi extracelular. La baza acestui proces ar sta, după Moulder (1974, 1985), o serie de procese de adaptare negativă, respectiv pierderea unor caractere neesențiale pentru viața intracelulară.

Conceptul a fost formulat de Lwoff (1943), într-o lucrare celebră („Evoluția fiziologică. Studiul pierderii funcțiilor la microorganisme"), și este susținut de o serie de observații de laborator:

Astfel, mutantele auxotrofe cultivate în medii ce conțin metaboliți pe care nu-i pot sintetiza sînt avantajate în comparație cu prototrofele care sînt obligate să îi sintetizeze singure. *Chlamydia* sp. și-a pierdut capacitatea de a stoca energia sub formă de compuși macroergici și este obligată la viața intracelulară, pentru a putea utiliza nucleotid trifosfații ATP din rezerva celulei-gazdă.

În sfîrșit, un alt argument este furnizat de mutantele cu deleții masive de gene structurale neesențiale, care, fiind scutite de replicarea, transcrierea și traducerea la proteine a genelor absente, sînt avantajate în raport cu celulele prototrofe sau cu mutantele punctiforme. Moulder (1974, 1985) consideră că reducerea genomului, prin pierderea genelor neesențiale, ar reflecta această modalitate de adaptare la mediul special care este celula-gazdă. În

acest sens, el aduce, ca argument, faptul că unii paraziți intracelulari analizați au genomuri mai mici (*Neisseria gonorhoeae* are aproximativ 1 000 de gene, *Chlamydia* aproximativ 500) spre deosebire de bacteriile libere (*Bacillus subtilis* 5 000—6 000 sau *Escherichia coli* 3—4 000 de gene). Deci, genomul bacteriilor parazite intracelular ar fi limitat la informația genetică minimă esențială pentru existența independentă într-o celulă-gazdă.

**Mecanismul evoluției bacteriilor parazite intracelular.** Au fost propuse două ipoteze privind modul de evoluție a bacteriilor spre parazitismul obligat-intracelular:

1) *Ipoteza evoluției convergente** consideră că adaptarea la habitatul intracelular ar reprezenta rezultatul final al evoluției unei varietăți de organisme neînrudite, care au suferit modificări asemănătoare, trăind în medii similare, ajungînd la același rezultat final prin mijloace diferite. După această ipoteză, microorganisme foarte diferite, ca *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia psittaci*, *Legionella pneumophila* etc. „au învățat" să trăiască intracelular, utilizînd aceeași strategie pentru evitarea distrugerii intracelulare (blocarea fuziunii fagolizosomale).

2) *Ipoteza evoluției divergente sau a radiației adaptative* („Adaptive radiation")** consideră că diversificarea evolutivă a apărut în grupurile mari de paraziți intracelulari, cu relații evolutive strînse, cunoscute sau presupuse, cînd paraziții cu origine comună s-au adaptat la gazde diferite și la căi diferite de transfer de la o gazdă la alta. Situația este ilustrată de bacteriile din genul *Rickettsia*, care cuprinde mai multe organisme strîns înrudite genotipic, cu mari asemănări fenotipice (morfologie celulară, structură internă, mod de cultivare), dar diferă în funcție de vector (*Rickettsia prowazekii*/păduchele de corp; *R. mooserii*/purecele de șobolan; *R. tsutsugamushi* și *R. rickettsii*/căpușe). Totodată, ele se deosebesc în funcție de sediul multiplicării intracelulare (nucleu sau citoplasmă), modul de eliberare din celula parazitată etc.

În mod asemănător, *Mycobacterium leprae*, patogen pentru om, este necultivabil, pînă în prezent, *in vitro*, în toate condițiile încercate, în timp ce *M. lepraemurium* (cu care are un grad de înrudire apreciat la >20%) poate fi cultivat *in vitro* pe medii complexe cu glutamat, citrat, piruvat, α-cetoglutarat, hemină, cit *c*, cisteină etc.

Analizînd comparativ argumentele pro și contra celor două mecanisme teoretic posibile, Moulder (1985) înclină spre ideea că proprietățile paraziților intracelulari pot fi cel mai bine atribuite evoluției convergenței în habitate intracelulare similare mai degrabă decît divergente de la o origine comună.

Parazitismul îndelungat produce o leziune minimă gazdei, iar pe termen lung, în cursul evoluției, poate duce la stabilirea unei relații de tip simbiotic. În cazul bacteriilor există și posibilitatea unei evoluții inverse, chiar pe

---

* *Convergența* — proces prin care „forme sau grupe *neînrudite îndeaproape* între ele (deci, cu origini filogenetice diferite) devin asemănătoare prin anumite trăsături morfologice și ecologice, adaptîndu-se la condiții de mediu asemănătoare". Explicația genetică completă a convergențelor este dificilă, asemănările fiind doar superficiale, în timp ce patrimoniul genetic este foarte diferit (Botnariuc, 1979).

** *Divergența* — trăsătură caracteristică a procesului evolutiv în ansamblul său, diversificarea formelor în procesul evoluției fiind o necesitate ce rezultă din însuși modul de acțiune al selecției. Selecția naturală tinde să elaboreze adaptări cît mai bune la anumite condiții concrete în care trăiește forma dată. Formele intermediare, care nu corespund în modul cel mai satisfăcător noilor condiții, vor fi treptat eliminate (Botnariuc, 1979).

termen foarte scurt, în sensul întreruperii procesului de atenuare și reversia la parazitism prin achiziția unor factori de virulență codificați de plasmide. Astfel, experimental a fost evidențiat un mecanism realizabil și în natură: bacteria *E. coli* comensală, infectată cu plasmide de aderență și enterotoxicitate, poate deveni brusc patogenă. Prin stabilirea și perpetuarea plasmidelor (eventual prin integrarea genelor respective în cromosom), poate deveni parazit obligat, capabil să infecteze organismele sensibile.

## PARAZITISMUL ASOCIAT CU TRANSFERUL NUCLEAR

Goff și Coleman (1984) au descris o formă nouă de parazitism, în care un parazit mic, alga roșie *Choreocolax*, își transferă nucleii în celulele unei gazde relativ îndepărtate sistematic, alga roșie *Polysiphonia*. Ei menționează că fenomenele de parazitism sînt foarte răspîndite în lumea algelor roșii, ~15% din genurile clasei *Florideophyceae* fiind parazite la alte alge roșii. Proprietatea cea mai neobișnuită a acestora este reprezentată de capacitatea de a forma conexiuni extensive intercelulare, numite „pit connexions" (engl. pit = capcane de presiuni, găuri naturale, cicatrice concavă, ca după variolă; connection = legare, unire).

În cursul procesului de diviziune, cele două celule-surori rămîn în contact intim. Septul despărțitor incomplet format este închis prin cîte un „dop" glicoproteic, determinînd formarea unor conexiuni primare („Primary pit connections"). Rețeaua de conexiuni „astupate" este considerată de algologi ca un sistem de conducte, deși nu s-a demonstrat transferul unor substanțe sau lichide prin intermediul lor.

Legături similare, numite *conexiuni secundare* („Secondary pit connections"), se formează și între două celule diferite, constituind, după Goff și Coleman (1984), structuri care mediază transferul de la o celulă la alta, explicînd astfel frecvența mare a formelor de parazitism asociate cu transferul nucleilor în celula-gazdă.

Concret, în cazul studiat de ei, alga filamentoasă fină *Choreocolax* se insinuează între celulele gazdei sale *Polysiphonia*, lungă de cîțiva cm (fig. 152). Celulele situate la extremitatea parazitului suferă un proces de diviziune asimetrică, producînd mici celule de legătură („conjunctor cell"), care conțin un mic nucleu condensat. Ele intră în legătură cu o celulă-gazdă adiacentă, formează o conexiune secundară, prin care nucleul parazitului

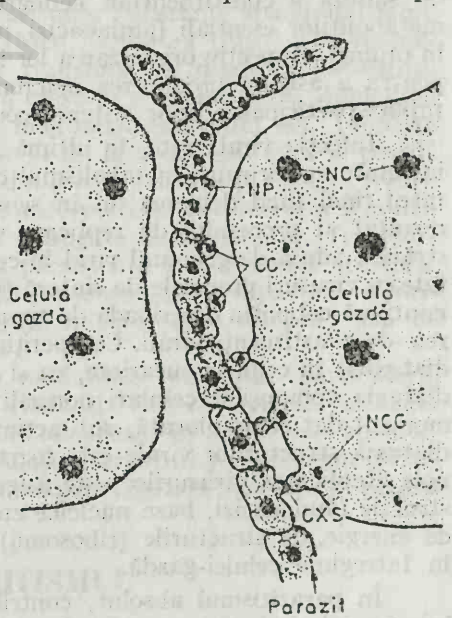



Fig. 152. — Parazitismul asociat cu invazie nucleară. Parazitul filamentos se dezvoltă între două celule-gazdă. Nucleul condensat al parazitului (NP), inclus într-o celulă conjunctor (CC) de reunire este apoi inserat în celula-gazdă, cînd se formează o conexiune secundară (CXS): NCG = nucleul celulei-gazdă (după Lewin, 1984).

este transferat în celula-gazdă. Aceasta suferă modificări profunde morfologice și de metabolism: mărirea dimensiunilor (de ~20 de ori), îngroșarea peretelui celular, apariția unor alterări citoplasmatice, multiplicarea mitocondriilor și cloroplastelor, acumularea produșilor de fotosinteză. Numărul nucleilor celulei-gazdă crește, ca și cantitatea de ADN. Cu toate acestea, celulele-gazdă supraviețuiesc și funcționează perioade îndelungate, cu nuclei străini dispersați în citoplasmă, ceea ce sugerează o atenuare a funcțiilor de recunoaștere self-nonself. Modificările sînt limitate la celulele invadate de parazit, cele adiacente, normale, rămînînd neafectate.

Această particularitate sugerează posibilitatea unui transfer concomitent de material genetic, pînă în prezent însă nedemonstrat.

## PARAZITISMUL ABSOLUT

Conceptul de parazitism absolut a fost stabilit de Lwoff (1953, 1981) în acțiunile sale de caracterizare științifică a virusurilor ca entități particulare, fără echivalent în lumea vie, pe baza stabilirii unor trăsături specifice sau caractere discriminatorii (marcînd diferențe absolute), absente la entitățile aparținînd lumii vii, așa cum sînt, în forma cea mai rudimentară, bacteriile.

În conformitate cu această concepție, Lwoff consideră că procesele de sinteză a constituenților celulari comportă două faze distincte: *sinteza* metaboliților esențiali (aminoacizi, nucleotide etc.) și *diataxia* (gr. = punerea în ordine), respectiv organizarea lor în secvențe specifice, sub control genetic, pentru a asigura producerea macromoleculelor specifice. Cele două procese implică participarea unor sisteme complet diferite.

Infecția virală este, în ultimă instanță, o infecție genetică. În celulele infectate cu virusuri, metabolismul celular suferă modificări esențiale, rezultatul final fiind devierea lui în sensul producerii de virus nou, progen, ca rezultat al procesului de replicare virală, pornind de la informația nouă, străină, adusă de genomul viral în celula-gazdă. Ca urmare, în celulele infectate cu virusuri procesele de sinteză (producerea de aminoacizi, nucleotide etc.) continuă cel puțin o perioadă de timp, deoarece sînt necesare pentru producerea de constituenți virali. Competiția dintre virus și celulă are loc la nivelul diataxiei: în celulele eucariote, ca și în bacteriile infectate cu virusuri (fagi), diataxia compușilor celulari normali este foarte mult diminuată sau la un moment dat chiar blocată, sub acțiunea unor constituenți virali, în timp ce diataxia structurilor virale este foarte activă, asigurînd producerea de virus nou. Replicarea virusurilor este asigurată de utilizarea materialelor de construcție (aminoacizi, baze nucleice etc.), de utilizare a sistemelor enzimatice, de energie, de structurile (ribosomii) și de moleculele de ARNt aparținînd în întregime celulei-gazdă.

În parazitismul absolut, contribuția parazitului este limitată exclusiv la genomul viral, care poartă informația genetică pentru reorientarea diataxiei, în sensul producerii de macromolecule specific virale și asamblării lor conform arhitecturii virusului infectant.

Parazitismul virusurilor marchează o diferență absolută, inexistentă în alte cazuri în natură. El se deosebește fundamental de parazitismul obligat intracelular al unor bacterii (ca, de exemplu, rickettsiile) în diferite celule eucariote. În acest caz, bacteriile găsesc, în mediul pe care îl parazitează,

adăpost, metaboliții necesari etc., dar își păstrează existența structurală și funcțională, fac biosinteze și cresc ca organisme unicelulare, utilizînd echipamentul enzimatic propriu pentru producerea de energie, pentru sinteză și diataxie, iar multiplicarea lor se realizează pornind de la ansamblul integrat al tuturor constituenților celulari.

## PARAZITISMUL GENETIC

Reprezintă o formă extremă de parazitism, în care microorganismul este prezent în celula-gazdă numai o scurtă perioadă de timp (Nester și Kosuge, 1981). Este tipic în cancerul bacterian al plantelor dicotiledonate (tumorile „Crown gall")* induse de bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Infecția este urmată de integrarea stabilă a unei părți din plasmida mare Ti (*T*umor *i*nduction) în ADN nuclear al celulei-gazdă.

Fenomenul a fost descris de Schell și Montagu (1979), sub denumirea de *colonizare genetică*. În conformitate cu acest concept, *Agrobacterium* și, probabil, alte bacterii au dezvoltat, în cursul evoluției lor, un mecanism complicat pentru a învinge barierele și mecanismele naturale ce împiedică schimburile dintre organisme neînrudite. Ca urmare, celula bacteriană poate transfera o parte din propria sa informație genetică plantei, în așa fel încît celulele vegetale exprimă o serie de caractere noi (proliferarea necontrolată, urmată de producerea de tumori și inducția sintezei unor substanțe aparținînd familiilor *opinelor: octopine* (Oct), *nopalină* (Nos), *agropină* (Ags), *agrocinopine* (Asc). Bacteriile beneficiază de această transformare deoarece pot utiliza selectiv opinele ca sursă de C și N pentru creștere și multiplicare, dobîndind un important avantaj față de celelalte microorganisme din sol. Prezența opinelor stimulează transferul plasmidelor Ti de la o bacterie care le posedă la orice altă tulpină lipsită de plasmidă din mediu (Nester și Kosuge, 1981). Totodată, țesuturile și celulele vegetale transformate se pot dezvolta și multiplica în absența auxinei și citokininelor adăugate de la exterior. Transformarea celulară are ca rezultat activarea persistentă a biosintezei acestora.

Un fenomen similar este realizat de *Pseudomonas syringae pv. savastanoi*, prezent în galele de pe plantele de măslin *(Olea europea)* sau de laur *(Nerium oleander)*.

Parazitismul genetic reprezintă o modalitate cu totul particulară, deoarece induce o transformare genetică (inducția sintezei opinelor utilizate ulterior de către bacterii) și o transformare oncogenă. El ilustrează capacitatea bacteriilor de a dezvolta în cursul evoluției structuri și mecanisme adaptate pentru a transfera gene bacteriene în celulele vegetale infectate și pentru a îmbunătăți asociația în avantajul lor.

## MICOPARAZITISMUL

Descris de De Bary (1965), micoparazitismul reprezintă o formă de simbioză parazitară între fungi-paraziți și fungi-gazdă, care implică, în esență, o relație nutrițională favorabilă pentru existența agresorului. Fungii-paraziți pot ataca miceliile, conidiile, conidioforii, sporangiile, sporangioforii, zoosporii, chlamidosporii, sclerotiile etc.

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 440.

Uneori, micoparazitismul este accidental. Alteori este bazat pe un tropism specializat, care facilitează contactul dintre cei doi parteneri. În unele cazuri, parazitul produce o secreție care determină ramificarea hifelor gazdei și modificarea creșterii lor în direcția apropierii de parazit. În altele, parazitul este dirijat spre miceliul-gazdă, care exercită un chimiotactism pozitiv.

Asociațiile micoparazitare variază de la un simplu contact limitat la suprafață, cu dezvoltare externă slabă sau nulă a parazitului, fără efecte vizibile, pînă la forme progresiv mai complicate ca: răsucirea parazitului în jurul hifelor-gazdă, fără să pătrundă în interiorul acestora sau cu pătrundere limitată sau extensivă. În unele cazuri apar structuri specializate, care favorizează relația parazitară, ca, de exemplu, apariția unor celule mici „de hrănire", adiacente hifei-gazdă *(Calcarisporium parasiticum)*, a unor ramificații absorbtive lungi și fine, care vin în contact cu gazda prin extremități turtite *(Gonadobotryum fuseum)*, sau ramificații scurte, globuloase, cu formare de „cîrlige", dezvoltate direct de la hifele parazite sau de la apresori*.

În unele cazuri, contactul parazit—gazdă este urmat de apariția unei perforații în peretele celular al acesteia — *punctul absorbtiv* — prin care parazitul vine în contact cu citoplasma celulei-gazdă.

Micoparazitismul este condiționat de capacitatea sporilor parazitului de a germina în prezența fungilor-gazdă.

Au fost descrise două tipuri de micoparazitism (Gäumann, 1946).

**Micoparazitismul biotrof**

Reprezintă o formă echilibrată în cursul căreia parazitul obține nutrienți dintr-o gazdă vie, fără a afecta capacitatea acesteia de a crește și de a produce metaboliți. În unele cazuri s-a demonstrat că relația este favorizată de tropismul reciproc al celor doi parteneri. Astfel, *Piptocephalis virginiana* prezintă tropism pentru tubii germinativi ai speciei-gazdă. În același timp, hifele gazdei, de la o distanță de ~ 50 μm, își schimbă direcția de creștere în sensul apropierii de parazit, sub influența unor substanțe secretate de acesta.

Barnett (1966) a descris mai multe modalități de interacțiune parazit—gazdă (fig. 153):

1) Pătrunderea în hifele gazdei cu ajutorul unei umflături asemănătoare apresorilor, printr-o ramificație fină, ca un „cîrlig", care rămîne neramificat sau formează un haustoriu **, cu un grup mic de ramificații fine (fig. 153);

2) Tropismul tubului germinativ al parazitului, care crește în direcția gazdei pînă cînd ajunge în contact intim cu aceasta;

3) Tropismul hifei-gazdă spre sporul în curs de germinare al parazitului;

4) Contactul dintre gazdă și parazit prin intermediul unei mici celule „tampon";

5) Formarea unor ramificații lungi și subțiri, terminate cu structuri turtite cu rol absorbtiv sau reprezentînd sediul sintezei unor enzime care măresc permeabilitatea învelișurilor hifelor-gazdă.

---

* Apresori — structuri diferențiate de pe miceliu cu rol de fixare.

** *Haustori* — structuri specializate diferențiate din miceliul fungilor-paraziți, capabile să pătrundă în interiorul celulelor-gazdă, din care prelau, prin osmoză, nutrienții.

Micoparazitismul biotrof poate evolua fără modificări aparente sau cu leziuni minime, determinate de competiția pentru nutrienți dintre parazit și gazdă. În unele cazuri, singurul efect vizibil este inhibarea creșterii fungilor-gazdă exteriorizată prin diminuarea biomasei produse în cursul cultivării pe medii lichide.

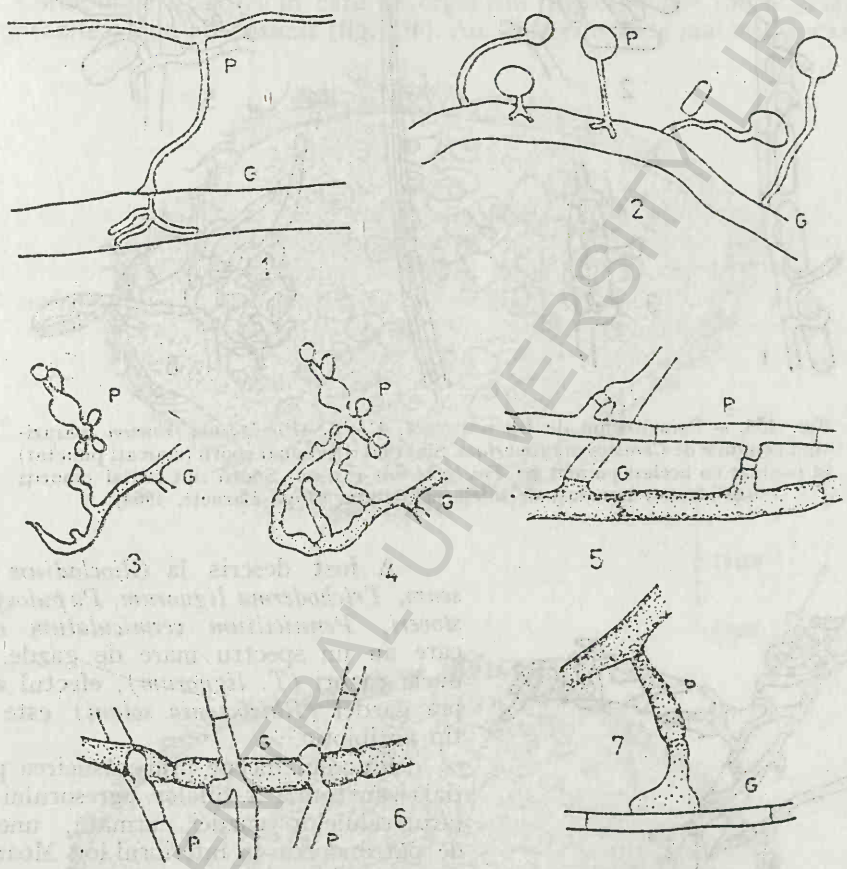



Fig. 153. — Modul de contact al unor micoparaziți biotrofi cu gazda lor: P = parazitul; G = gazda. **1.** Pătrunderea hifelor gazdei de către *Piptocephalis virginiana* printr-o umflătură similară apresorilor și prin haustori. **2.** Tropismul tubilor germinativi ai parazitului care cresc în direcția hifelor gazdei. **3—4.** Tropismul hifelor gazdei (*Physalospora obtusa*) spre sporul germinat al parazitului (*Calcarisporium parasiticum*). **5.** Modul de contact între *C. parasiticum* și gazda sa prin intermediul unei mici celule-tampon. **6.** Modul de contact între *Gonatobotrys simplex* și gazdă (*Alternaria tenuis*) **7.** Modul de contact între *Gonatobotryum fuscum* și gazdă (*Graphium* sp). (după Barnett, 1964).

## Micoparazitismul necrotrof

Evidențiat în natură, în special pe fructele cărnoase, corespunde situației în care parazitul omoară fungii-gazdă după contactul fizic sau pătrunderea în structura lor (fig. 154).

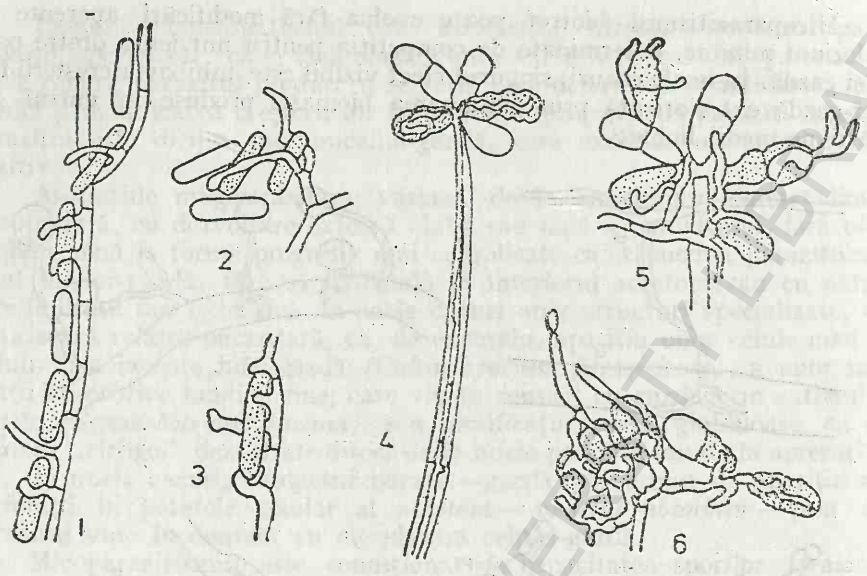



Fig. 154. — Parazitismul de tip necrotrof. 1 — 3. *Gliocladium roseum* parazitînd conidiile de *Ceratocystis fimbriata*. Sînt omoriți numai sporii (marcați punctat) în contact cu același parazit pe *Trichothecium roseum*. Sporii sînt inițial omoriți și ulterior invadați de hifele parazitului (după Barnett, 1964).

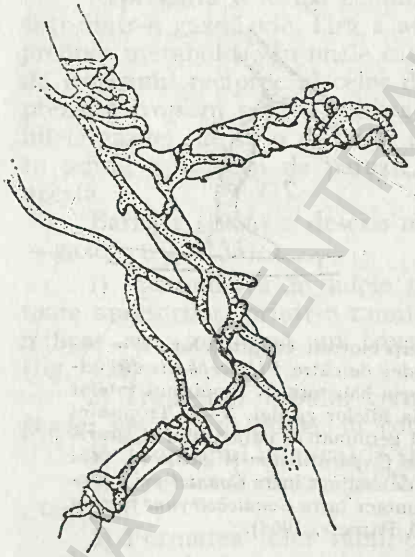


Fig. 155. — Micoparazitismul. Hifele de *Trichoderma* se răsucesc în jurul hifelor mai groase ale fungilor patogeni *(Rhizoctonia solani)* înainte de a pătrunde în interiorul lor, prin liza peretelui celular (după Deacon, 1983).

A fost descris la *Gliocladium roseum*, *Trichoderma lignorum*, *Papulospora stoveri*, *Penicilium vermiculatum* etc., care au un spectru mare de gazde. În unele cazuri *(T. lignorum)*, efectul asupra gazdei *(Rhizoctonia solani)* este de tip antibiotic.

Procesul începe prin răsucirea parțială sau totală a hifelor agresorului în jurul celulelor gazdei, urmată, uneori, de pătrunderea în interiorul lor. Moartea este determinată de enzime litice sau de toxine nespecifice produse de agresor și de absorbția nutrienților din celula omorîtă (fig. 155). Gradul de distrugere a gazdei este influențat de rezistența și de nutriția ei, ca și de condițiile de mediu.

Au fost descrise două grade de rezistență a gazdei, manifestate prin limitarea acțiunii parazitului sau prin dezintegrarea hifelor parazite.

*Hipermicoparazitismul* corespunde situației în care o specie fungică este parazită pe alta, care, la rîndul său, parazitează o a treia. Un exemplu mai

mult studiat este cel reprezentat de *Chytridium parasitium*, care parazitează *C. urceolatum*, la rîndul său, parazit pe *Rhizidium richmondensi*.

### Hiperparazitismul

Corespunde situației în care un organism (hiperparazit sau superparazit) parazitează un alt parazit (fig. 156). Au fost semnalate mai multe cazuri,

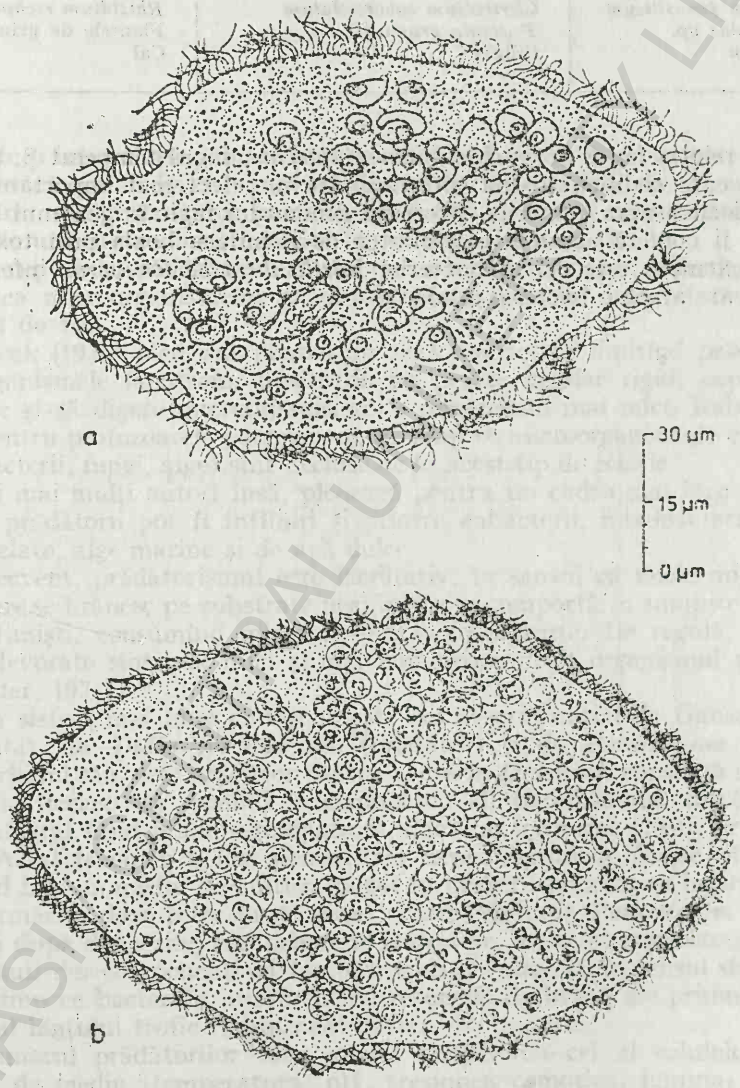



Fig. 156. — Hiperparazitismul. Reprezentarea schematică a unor celule de *Entamoeba* sp., hiperparazite în celulele unui ciliat (*Zelleriella*), prezent în rect la *Bufo* sp.: a = stadii vegetative; b = chişti de *Entamoeba* (după Stabler şi Chen, 1956).

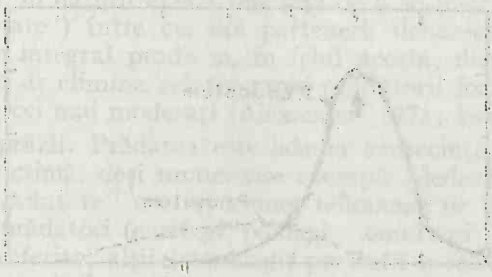
între care următoarele citate de Alexander (1971) (tabelul următor):

| Hiperparazitul | Parazitul | Gazda |
|---|---|---|
| Fagul β | *Corynebacterium diphteriae* | Omul |
| Bacteriofag | *Pseudomonas tabaci* | Plantele de tutun |
| *Chytridium parasiticum* | *Chytridium suburceolatum* | *Rhizidium richmondense* |
| *Xanthomonas* sp. | *Puccinia graminis* | Plantele de grîu |
| *Allantosum* | Ciliate | Cal |

În relația fag β/*Corynebacterium diphteriae*, fagul temperat β, purtător al genei care codifică toxina difterică, are un efect mai important asupra omului decît asupra bacteriei. Prezența genomului fagic în genomul bacteriei lizogene îi conferă acesteia capacitatea de a induce boala prin toxigeneză. Un alt exemplu este cel al bacteriei *Bdellovibrio bacteriovorus* infectată de un fag, care atacă o bacterie-gazdă.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# PRĂDAREA



Este o interrelație în care un organism mai mare, mai viguros —prădătorul— atacă un al doilea, provocîndu-i moartea, rapidă, în cazul prăzii unicelulare, sau distrugerea parțială sau totală, în cazul celei multicelulare, urmată de utilizarea constituenților lor ca material nutritiv.

Conceptul de prădător este destul de ambiguu, deoarece, în multe cazuri, activitatea microorganismelor prădătoare este greu de deosebit de parazitism sau de liză.

Brock (1976) pledează pentru un sens restrictiv, limitînd prădarea la microorganismele fagotrofe, lipsite de un perete celular rigid, capabile să înglobeze și să digere microorganisme cu dimensiuni mai mici. Relația este tipică pentru protozoarele bacterivore, în timp ce microorganismele cu perete rigid (bacterii, fungi, alge) sînt excluse de la acest tip de relație.

Cei mai mulți autori însă, pledează pentru un cadru mai larg considerînd că prădătorii pot fi întîlniți și printre eubacterii, mixobacterii, fungi, dinoflagelate, alge marine și de apă dulce.

Frecvent, prădătorismul este facultativ, în sensul că unele microorganisme care se hrănesc pe substrate neanimate se comportă în anumite condiții ca oportuniști, consumînd microorganisme corezidente. De regulă, celulele speciei devorate sînt mai mici și mai numeroase decît organismul prădător (Alexander, 1971).

Un sistem mai bine cunoscut este cel descris inițial de Gause (1934), reprezentat de *Didinium nasutum* (prădător) și de *Paramecium* (pradă), care, la rîndul său, este prădător pentru bacterii. *Didinium* consumă un *Paramecium* la fiecare oră, venind în contact cu el, paralizîndu-l, după care îl digeră integral. Cînd prada este epuizată, dacă nu formează chiști, prădătorul moare. Acest fenomen a fost demonstrat experimental de Gause (fig. 157), adăugînd într-un mediu de cultură bogat în bacterii (pentru ca interacțiunea să fie urmărită doar între protozoare), cinci celule de *Paramecium* (la timpul 0) și după două zile; trei celule de *Didinium*. În acest microcosmos limitat, ultimii doi componenți ai lanțului trofic evoluează în sensul dispariției lor, în timp ce bacteriile, reprezentînd resursele de hrană ale primului component al lanțului trofic rămîn neutilizate.

Numărul prădătorilor este corelat pozitiv cu cel al celulelor-pradă. Factorii de mediu (temperatura, pH, presiunea osmotică, lumina) influențează indirect, putînd modifica densitatea relativă a celor doi parteneri. În general, numărul prădătorilor crește cînd hrana este bogată, dar cînd devin suficient de numeroși, densitatea prăzii scade, deoarece multiplicarea ei nu poate compensa ritmul distrugerii. Cînd sursa de hrană vie scade

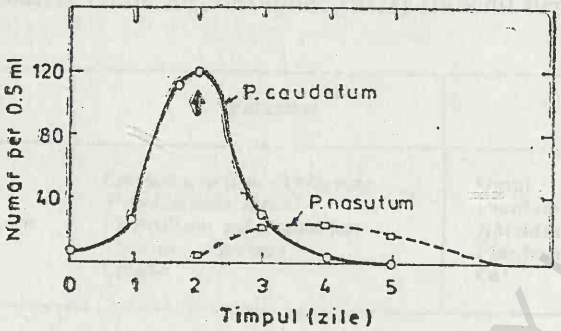



Fig. 157. — Interacțiunea inițială dintre *Paramecium caudatum* și *Didinium nasutum*. Inoculum inițial — 5 celule de *P. caudatum*, în ziua 0, într-un mediu care conține bacterii ca nutrient. În ziua a 2-a (săgeata dublă) se adaugă 3 celule de *D. nasutum*. Final sînt eliminați atît *Paramecium*, cît și *Didinium*, iar bacteriile rămîn neutilizate (după Gause, 1934).

sub o anumită limită, scade și numărul prădătorilor, creînd condiții pentru multiplicarea prăzii. Utilizînd sistemul *Paramecium bursaria* (prădător)/ *Schizosaccharomyces pombe* (pradă), Gause (1934) a confirmat existența acestui fenomen *in vitro* (fig. 158), însă existența sa probabilă nu a fost evidențiată cu aceeași intensitate în natură.

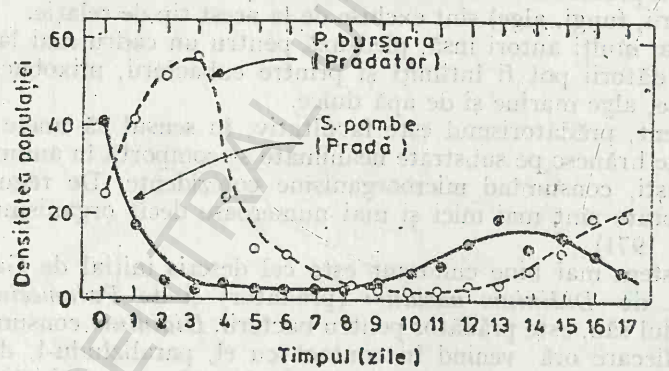



Fig. 158. — Fluctuația densității populației de *Paramecium bursaria* crescută pe *Schizosac charomyces pombe in vitro* (după Gause, 1934).

**Aspecte cantitative ale prădării.** Deși datele privind efectele prădării provin numai din observații de laborator și sînt relativ puține și vechi, ele sînt suficient de sugestive pentru semnificația acestui proces în mediile naturale. *Paramecium caudatum* consumă ~ 18.000 celule de *Bacillus subtilis* în intervalul dintre două diviziuni sau $5 \times 10^6$ celule de *Escherichia coli*. *Amoeba proteus* ingeră 28—47 celule de *Tetrahymena pyriformis*. Heal (1967) apreciază că amibele dintr-un m² de sol consumă ~ 500 g de microorganisme/an.

Determinarea valorilor respective direct în mediile naturale este greu de realizat deoarece, spre exemplu, unele protozoare prădătoare ingeră simultan bacterii, levuri, spori de mucegaiuri sau chiar alte protozoare.

În general, în natură există tendința de a se instala o reacție de echilibru („Steady state") între cei doi parteneri, deoarece un prădător foarte agresiv distruge integral prada și, în felul acesta, dispare și el. De aceea, selecția naturală ar elimina relativ rapid prădătorii foarte agresivi și voraci, menținîndu-i pe cei mai moderați (Alexander, 1971; Brock, 1973, 1976).

**Alegerea prăzii.** Prădarea este adesea consecința unui contact fortuit cu organismul-victimă, deși numeroase exemple pledează pentru intervenția unui proces de „căutare" a ei și a unor fenomene de chimiotactism. Astfel, în timp ce unii prădători (eurifagi, polifagi, „omnivori") agresează un număr mare de specii diferite, alții (stenofagi) prezintă o selectivitate foarte mare, hrănindu-se cu membrii unui singur gen. Astfel, prădătorii *Didinium nasutum* și *Woodruffia metabolica* atacă numai *Paramecium*. În schimb, *Dictyostelium discoideum* utilizează ca pradă numeroase bacterii (*Bacillus* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. etc.), iar *Mayorella bigemma*, o serie de ciliate, diatomee, flagelate, rizopode, rotifere ș.a.

După Alexander (1971), majoritatea prădătorilor ocupă o poziție medie, în sensul că stenofagia nu ar reprezenta un caracter absolut, ci o preferință. În unele cazuri, ea nu este înnăscută, ci determinată de condiții de mediu, respectiv de prezența unui număr mic sau chiar a unei singure specii-victimă, ca unică sursă de hrană disponibilă.

Un caz extrem este *canibalismul* (prădarea și hrănirea cu organisme aparținînd aceleiași specii) descris la *Amoeba*, *Stentor* etc., determinat, probabil, de lipsa oricărei alte victime.

Chet, Fogel și Mitchell (1976) pledează pentru existența unei comunicări chimice între pradă și prădător, cu mecanisme moleculare similare celor ce joacă un rol central în comportamentul sexual, în determinarea teritoriului, în migrare sau în agregare celulară. În cazul unor bacterii care atacă fungii (*Pythium debaryanum*) și diatomeea *Skeletonema costatum*, prădarea ar fi inițiată de prezența în mediu a unor substanțe (monomere sau oligomere) eliberate din autoliza lentă normală a peretelui celular al victimei, care acționează ca atractant foarte specific pentru prădător. Acesta dispune de un număr relativ important de chemoreceptori de suprafață. După ce ajunge în contact cu victima, prădătorii eliberează enzime extracelulare, care amplifică liza peretelui celular și eliberarea de atractanți.

În mediile naturale, în care prada este adesea foarte limitată, capacitatea microorganismelor prădătoare de a se orienta în raport cu localizarea ei reprezintă un puternic avantaj selectiv.

## PROCARIOTELE PRĂDĂTOARE

**„Prădarea nu este o descoperire a eucariotelor..."**

R. GUERRERO

Relațiile ecologice dintre bacterii au dobîndit o nouă dimensiune prin descoperirea capacității lor de prădare, care se poate exercita pe două căi majore.

## PRĂDAREA EXTRACELULARĂ

Se realizează prin activități enzimatice exercitate din afara celulei-pradă. Este de menționat că, deși capacitatea de a produce enzime extracelulare este foarte răspîndită în lumea bacteriilor, numai puține dintre acestea pot ataca, dizolva și digera celulele bacteriene vii.

Prădarea extracelulară se poate produce pe mai multe căi:

1) **Liza prin exoenzime** este întîlnită la *Myxobacteriales*, organisme strict aerobe, organotrofe, cu un ciclu de viață sofisticat, implicînd formarea de structuri coloniale multicelulare, cu forme complexe, prin acțiunea coordonată a unui număr mare ($10^5$—$10^7$) de celule „roitoare", care își păstrează individualitatea fizică. Structurile complexe, multicelulare, au avantajul de a asigura o mare densitate celulară într-o anumită regiune, precum și o concentrație mare de enzime hidrolitice extracelulare, care atacă pereții celulari ai bacteriilor, precum și proteaze, nucleaze, lipaze etc.

Mixobacteriile nu se dezvoltă exclusiv pe celule vii, însă caracterul de prădător a fost evidențiat în studii experimentale de laborator: creșterea lor este mult mai intensă pe bacterii Gram-pozitive *(Micrococcus luteus)* sau Gram-negative *(Escherichia coli)* vii decît pe bacterii moarte.

2) **Prădători extracelulari aerobi.** Casida (1982) a studiat o bacterie prădătoare pe alte bacterii din sol, pe care a descris-o sub denumirea de *Ensifer adhaerens* (Ensifer = purtătoare de sabie). Ea se prezintă sub forma unor celule mici, rotunjite (0,7—1,1 × 1,0—1,9 μm), izolate sau perechi, aerobe și Gram-negative, avînd 3—5 flageli dispuși subterminal. Este facultativ prădătoare. Cînd atacă bacteriile vii, se fixează pe suprafața lor, pe care o înconjură într-un mod asemănător scîndurilor de la un gard. Efectul litic se exercită prin intermediul unor factori difuzibili, activi atît pe bacteriile Gram-pozitive, cît și pe cele Gram-negative.

Lambina și colab. (1983) au evidențiat prezența, în unele ape reziduale, a două specii încadrate în genul nou *Micavibrio* (Mica = foarte mic). Ele se comportă ca prădători obligați avînd specificitate de gazdă. Nu se dezvoltă pe medii complexe în laborator. *Micavibrio admirandus* atacă numai celulele de *Pseudomonas maltophila*, iar *M. aeruginosavorus* pe cele de *P. aeruginosa*. Celulele de *Micavibrio* sînt Gram-negative, au dimensiuni de 0,25 — 0,4 × × 0,6 — 1,0 μm și flagel unic polar. Cînd se leagă de pradă își pierd flagelul, aderă paralel cu axul lung al acesteia, pentru a avea un cît mai mare contact intercelular, și determină liza.

*Vampirovibrio chlorellavorus* este o bacterie descrisă, din anul 1972, de Gromov și Mamkaeva. Acțiunea sa prădătoare se exercită exclusiv pe celulele de *Chlorella vulgaris*. Este o bacterie Gram-negativă, vibrioid-helicală, microaerofilă, care se deosebește net de *Bdellovibrio* cu care a fost frecvent confundată.

Principalele deosebiri decurg din: 1) capacitatea de a prăda în mod specific o celulă eucariotă (alga *Chlorella)*; 2) de a crește în afara prăzii și de a nu se dezvolta în interiorul ei; 3) posedă un flagel lipsit de teacă.

3) **Bacteriile prădătoare anaerobe imobile.** Au fost descrise ca morfologie inițial de Bavendam (1924), care le-a considerat ca „muguri" pe suprafața celulelor de *Chromatium weissei* și de *Thiospirillum* sp. Au fost redescoperite și reconsiderate de Esteve, Guerrero și colab. (1983) în apele unor lacuri carstice, care conțin mari cantități de gips ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), de

$H_2S$ și numeroase bacterii sulfuroase purpurii din familia *Chromatiaceae* în sedimente (lacul Estanya, apropiat de orașul Benabarre din provincia Huesca și lacurile Ciso și Vilar din provincia Gironia). În aceste lacuri, bacteriile sulfuroase purpurii și verzi ajung în regiunile încă slab iluminate ale coloanei de apă și ale sedimentelor.

Bacteria prădătoare activă descrisă sub numele de *Vampirococcus* atacă celulele de *Chromatium minus*, de care se leagă, determinînd formarea unei breșe în învelișurile celulare, prin care „suge" conținutul celular provocînd liza celulei-gazdă. În ultimă instanță, din celula prădată nu mai rămîn decît învelișurile celulare și incluziunile de poli-β-hidroxibutirat și sulf. Atacul celulei-pradă este asociat cu diviziunea binară a prădătorului.

## PRĂDAREA INTRACELULARĂ

Este de două tipuri, corespunzînd prădătorilor periplasmatici *(Bdellovibrio)* și celor citoplasmatici *(Daptobacter)*.

## BACTERIILE PRĂDĂTOARE PERIPLASMATICE *BDELLOVIBRIO* sp.

Descoperite accidental de Stolp (1962), prin însămînțarea extractului de sol pe o cultură de *Pseudomonas phaseolica*, bacteriile din genul *Bdellovibrio* (gr. bdellos=lipitoare, parazit, exploatator), sînt parazite endocelulare, prădătoare și bacteriolitice.

În stadiul extracelular au formă de vibrion (1 — 2 μm×0,25 — 0,40 μm) și sînt Gram-negative. Extremitatea anterioară „de atac" este prevăzută cu o structură caracteristică („tamponul de fixare" sau „cramponul"), considerată de unii autori ca un artefact. Extremitatea posterioară este prevăzută cu un flagel foarte gros ( ~ Ø 28 nm) cu o regiune internă centrală (Ø ~ 13 nm) și o teacă înconjurătoare, în continuarea peretelui celular. Au o mobilitate foarte mare, apreciată la ~ 100 lungimi ale corpului celular / secundă.

Au fost descrise trei specii: *B. bacteriovorus*, *B. starii* și *B. stolpii*. Spectrul de gazde identificate pînă în prezent include *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacteriaceae*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* etc.

**Interacțiunea parazit — gazdă** implică o serie de evenimente complexe:

*Contactul inițial* are la bază mecanisme specifice și reversibile, deși cel mai frecvent este favorizat de apropierea prin chimiotaxie și recunoașterea prăzii. Dovadă este faptul că *Bdellovibrio* atacă atît celulele sensibile, cît și pe cele insensibile, dar se leagă permanent numai de primele. Atacul este realizat prin coliziuni violente (cîteva secunde) urmate de legarea de suprafață a celulei-gazdă prin extremitatea neflagelată.

Legarea concomitentă a mai multor celule de *Bdellovibrio* de o singură bacterie determină leziuni litice multiple („lysis from without") înaintea multiplicării intracelulare.

**Pătrunderea în celula-gazdă** se realizează prin diacitoză și necesită producerea unor leziuni ale peretelui celular.

Stolp (1973) consideră că *Bdellovibrio* ar acționa ca un sfredel, rotindu-se cu ~ 100 rotații/secundă în jurul axului său lung. Ipoteza este greu de conciliat cu legarea fermă a parazitului de celula-gazdă.

Mai probabil ar fi vorba de o mișcare de „pivot în mufă" (engl. „Arm-in-socket"), de pivotare a regiunii posterioare, fără rotație la capătul anterior (de lezare). Perforarea ar fi favorizată de prezența unor spicule la polul de

legare evidențiate la unele tulpini. Oricum, porul produs este mai mic decît *Bdellovibrio*, astfel că, deși rigiditatea regiunii înconjurătoare este diminuată pe cale enzimatică, bacteria trebuie să sufere o constricție evidentă pentru a-l putea străbate. După pătrundere, peretele celular este reparat și închis. Această fază durează în total 5—60 minute, dar numai cîteva secunde din momentul formării porului (fig. 159).

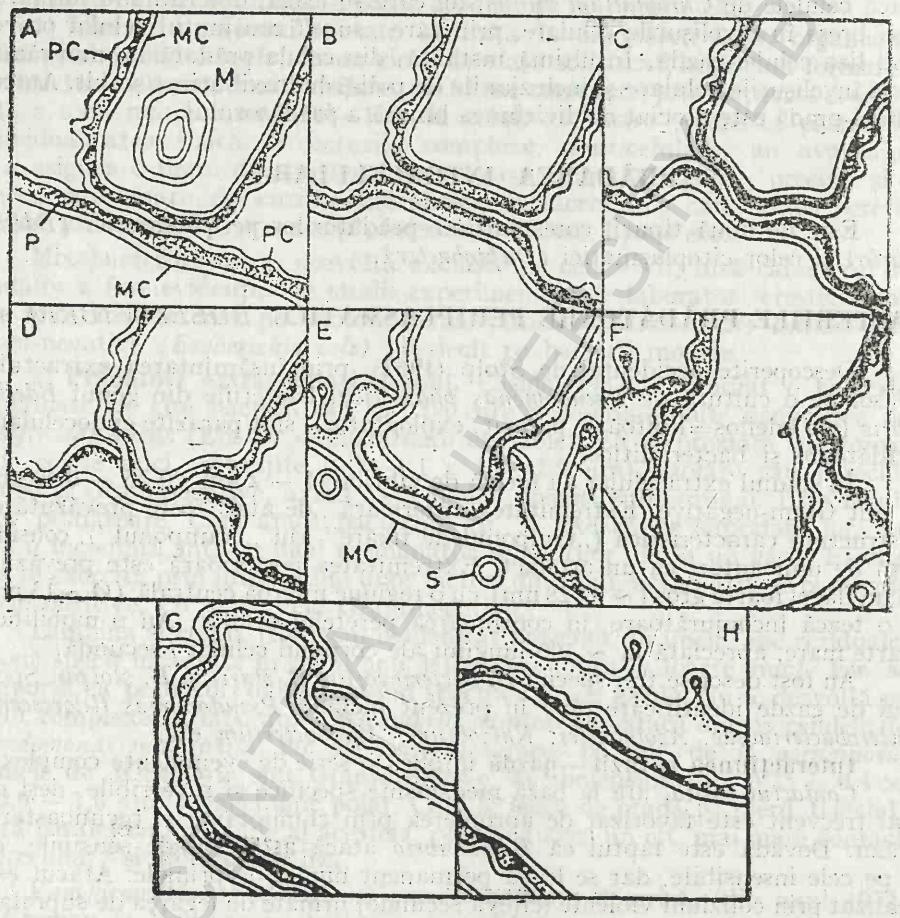



Fig. 159. — Reprezentarea schematică a etapelor pătrunderii bacterici *Bdellovibrio bacteriovorus* în *Escherichia coli*: PC = peretele celular; MC = membrana citoplasmatică; M = mezosom; P = stratul dens peptidoglicanic; V = vezicule; S = sferule (după Burnham, Hashimoto și Conti, 1968).

**Multiplicarea intracelulară** se realizează, în realitate, într-un spațiu închis, extracitoplasmatic, respectiv intramural sau intraperiplasmic. Această așezare are avantajul de a evita reacțiile de apărare ale gazdei.

După invadare, în ~ 30 minute, celula invadată este transformată din bacil într-un „corp globulos" („Sphaerical body") sau *bdelloplast*. Ea suferă modificări severe, chiar înainte ca agresorul să se multiplice: inhiba-

rea și blocarea sintezei de ADN, de ARN și de proteine, perturbarea activităților respiratorii, consecutivă lezării membranei celulare, modificări nucleare etc.

Alterarea integrității mureinei și creșterea permeabilității celulare determină o mărire considerabilă a volumului celulei invadate.

Unele enzime (glicanaze) sintetizate de *Bdellovibrio*, degradează peptidoglicanul parietal, în timp ce altele hidrolizează grupările N-acetil din structura acestuia, făcîndu-l nepotrivit ca substrat pentru glicanaze, și îndepărtează acidul diaminopimelic și acizii grași cu lanț lung din peretele bdeloplastului. Datorită acestor modificări, alte bacterii nu mai pot perfora peptidoglicanul deacetilat și, în felul acesta, primul *Bdellovibrio* intrat este la adăpost de concurenți, putînd utiliza în exclusivitate constituenții celulei-gazdă.

Sursa majoră de energie este furnizată de ATP produs prin oxidarea aminoacizilor (în special a glutamatului) eliberați prin hidroliza proteinelor gazdei. Utilizarea energiei este foarte eficientă, la limita teoretic posibilă pentru un organism care realizează numai polimerizarea specifică a monomerilor proveniți din celula-gazdă.

În acest timp, celulele de *Bdellovibrio* cresc filamentos spiralate, pînă la epuizarea hranei, devenind de cîteva ori mai lungi decît forma infectantă, digerînd citoplasma din calea lor.

Multiplicarea parazitului se realizează prin fragmentare în celule mobile, identice cu cele infectante, care pot umple celula-gazdă.

Numărul lor este variabil: 4—6 la *Escherichia coli*, 8—12 la *Pseudomonas fluorescens*, 20—30 la *Spirillum serpens*, iar în cazuri extreme, 50—100/per bacterie-gazdă.

**Eliberarea** lor în mediu se produce brusc, odată cu distrugerea învelișurilor bacteriei-gazdă.

De menționat că degradarea progresivă a sferoplaștilor (singura sursă de nutrienți și energie) este controlată de parazit și corelată cu multiplicarea acestuia (fig. 160). Ca urmare, numai puțini constituenți structurali sau enzimatici sînt pierduți în mediu și exclusiv în perioada tardivă a ciclului de infecție.

Mecanismul lizei celulare este, probabil, parțial heterolitic (determinat de muramidaze, specifice pentru peptidoglicanul deacetilat, proteinaze și lipaze produse de agresor) și parțial autolitic (prin perturbarea mecanismelor de control ale gazdei).

**Ecologie.** *Bdellovibrio* sp. este răspîndit în foarte multe medii naturale în număr variabil: $10^3$—$10^5$/g în sol, $10^5$/ml în ape uzate, 50 celule/ml în mediul marin.

**Semnificația ecologică** nu este exact cunoscută, deși nu este exclus un rol semnificativ în apele poluate.

Tulpinile izolate din mediile naturale aparțin la trei categorii distincte:

1) Tulpinile „sălbatice", parazite HD („Host dependent") nu cresc decît intracelular, în bacterii vii sau pe medii complexe suplimentate cu „factorul gazdă"* sau cu suspensii bacteriene inactivate termic, în prezența $Ca^{2+}$ și $Mg^{2+}$.

---

* „Factorul gazdă", prezent la multe bacterii în spațiul periplasmatic este obținut prin expunerea acestora la acțiunea ultrasunetelor. Este format din fracțiuni acelulare (g. m. 50 kdal) și conține în special ARN și proteine.

2) Tulpinile HI („Host independent") sînt saprofite. Sînt lipsite de flagel și apar sub forma unor filamente lungi, care pot depăși, în cazuri extreme, de 80 de ori lungimea celulelor sălbatice.

3) Tulpinile HID sînt formate din celule ce cresc saprofit, dar păstrează capacitatea facultativă de prădare.

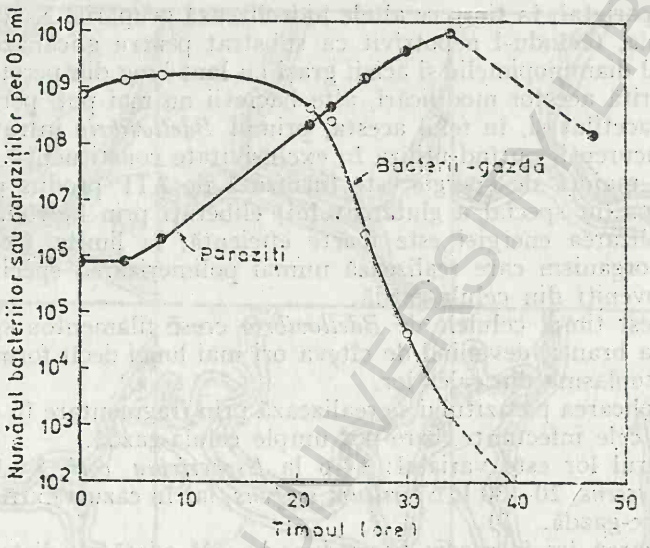



Fig. 160. — Dezvoltarea bacteriei *Bdellovibrio bacteriovorus*, tulpina Bd. 100 pe o cultură de *Erwinia amylovora* (după Stolp și Starr, 1963).

Mutația HD → HI asigură capacitatea de a face sinteza „factorului gazdă" și are ca suport molecular derepresarea genelor care asigură creșterea pe medii artificiale. Mutația HI → HD are un mecanism invers.

Pe baza acestor date, Shilo (1973) a elaborat ciclurile de viață ale formelor saprofite și prădătoare (fig. 161). Ele furnizează un model experimental foarte util pentru studiul interacțiunilor paraziților intracelulari cu celula-gazdă.

## BACTERIILE PRĂDĂTOARE CITOPLASMATICE

Prezente în aceleași medii acvatice din care a fost izolat *Vampirococcus*, bacteriile din genul *Daptobacter* (gr. „Dapto" = a roade, a devora, a distruge) sînt bacili (0,5—0,6 × 1,5 — 2,0 μm), cu trei flageli polari, Gram-negativi. Celulele-pradă sînt reprezentate de *Chromatium vinosum*, *C. minutissimum*, *Lamprocystis* sp. și *Thiocapsa roseopersicina*. Bacteria prădătoare se leagă perpendicular pe suprafața acestora, distruge peretele celular și membrana citoplasmatică și pătrunde intracelular (fig. 162). După distrugerea celulelor-pradă, respectiv după aproximativ 7 zile, determină pe mediile de cultură apariția unor plaje de liză cu Ø 0,5 cm, colorate roșu pal.

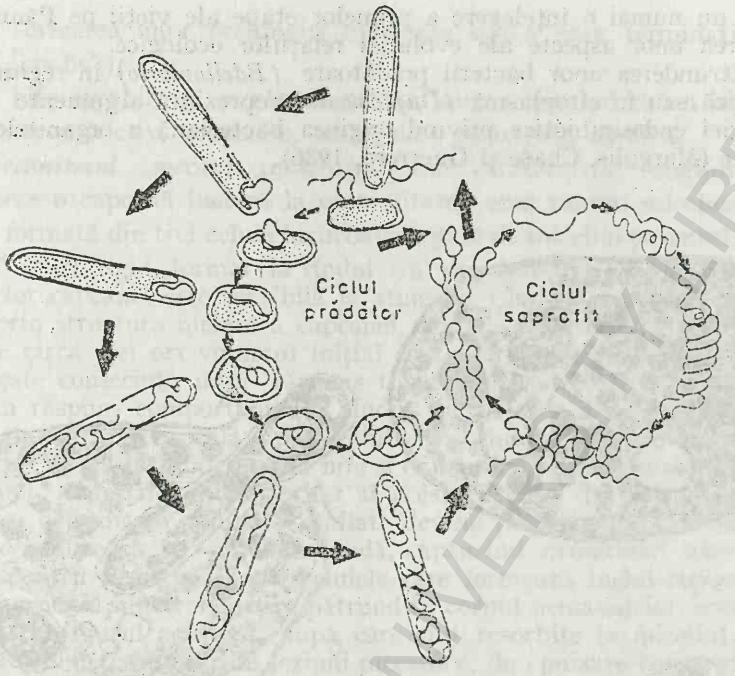



Fig. 161. — Reprezentarea schematică a ciclului de viață al bacteriei *Bdellovibrio bacteriovorus* în interiorul și în afara celulelor-gazdă (după Shillo, 1973).

**Semnificația biologică.** Guerrero și colab. (1987) au preferat denumirile de ,,prădător'' și ,,pradă'' celor de ,,parazit'' și ,,victimă'' pe mai multe considerente:

1) pentru că distincția dintre prădător și parazit, bazată în mod uzual pe dimensiunile relative ale celor doi parteneri, este considerată de mulți cercetători ca neadecvată;

2) pentru a se încadra în conceptele stabilite (lucrarea fundamentală cu caracter normativ ,,Bergey Manual of Systematic Bacteriology'' (1984), care stabilește caracterul de ,,prădător'' pentru *Bdellovibrio* sp. și de ,,pradă'' pentru bacteriile cu care se hrănește.

Unele bacterii prădătoare evidențiază relații nutriționale încă necunoscute în lumea procariotelor. Astfel, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Vampirococcus* și *Daptobacter* care pradă alga *Chlorella* și respectiv bacteriile fotoorganotrofe sînt consumatori primari, echivalenți organismelor fitofage, deoarece se hrănesc cu organisme fotoautotrofe. Guerrero și colab. (1986, 1987), precum și Margulis, Chase și Guerrero (1986) consideră că relația de prădatorism a apărut inițial la procariote, în ecosistemele anoxice din Archeanul timpuriu sau în Proterozoic (acum 3 400 pînă la 570 milioane de ani) cînd microorganismele erau singurii locuitori ai pămîntului. În felul acesta se poate presupune că în perioadele respective, cînd bacteriile fototrofe erau singurii producători primari și bacteriile heterotrofe singurii consumatori, între primele procariote au existat relații ecologice absolut analoge cu cele existente în prezent între eucariote. De aceea, ei consideră că studiul acestor sisteme

permite nu numai o înțelegere a primelor etape ale vieții pe Pământ, ci și înțelegerea unor aspecte ale evoluției relațiilor ecologice.

Pătrunderea unor bacterii prădătoare *(Bdellovibrio)* în regiunea periplasmatică sau în citoplasmă *(Daptobacter)* reprezintă argumente în favoarea teoriei endosimbiotice privind originea bacteriană a organitelor celulei eucariote (Margulis, Chase și Guerrero, 1986).

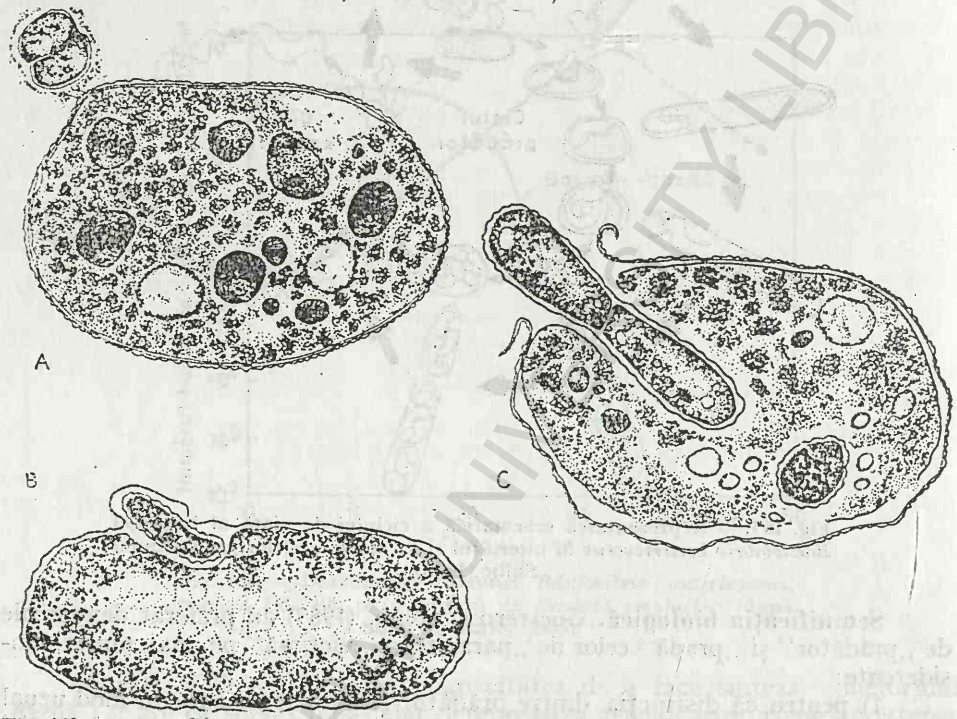



Fig. 162. — Relațiile dintre bacteriile prădătoare și gazdele lor. **A.** *Vampirococcus* se leagă de peretele celular al mai multor specii de *Chromatium* și se divide epibiotic, degradînd citoplasma gazdei. **B.** *Bdellovibrio* atacă bacteriile heterotrofe Gram-negative, la care se localizează și se divide prin segmentare, formînd mai multe celule-fiice aranjate linear în spațiul periplasmatic. **C.** *Daptobacter* pătrunde în citoplasma speciilor de *Chromatium*, unde se divide binar (după Guerrero și colab., 1986).

## FUNGII NEMATOFAGI

Grup ecologic natural format din fungi taxonomic diferiți (~ 50 de specii identificate dintre *Deuteromycetes*, unele *Phycomycetes* și un caz dintre *Basidiomycetes)*, unificat prin adaptarea lor la un comportament prădător, fungii „nematofagi" sînt capabili să captureze, să omoare și să consume viermi microscopici.

Principalele specii studiate aparțin genurilor *Arthrobotrys, Dactylella, Trichothecium* etc.

**Mecanismele de acțiune.** Fungii care capturează nematode prezintă diferite adaptări structurale specializate menite să realizeze această funcție:

1) rețele tridimensionale formate prin ramificarea și adeziunea unor hife nediferențiate;

2) formarea unor prelungiri lipicioase sau a unor terminații proeminente („knobs");

3) hife capabile să se răsucească sau anse acționînd ca un laț constrictiv sau neconstrictiv, acoperite, toate, de o substanță adezivă.

*Mecanismul „mecanic constrictiv"* este caracteristic fungilor capabili să formeze o capcană inelară la extremitatea unei ramuri miceliene scurte. Ea este formată din trei celule incurbate, legate de miceliul parental printr-un „picior" scurt, rigid, format, la rîndul său, din două-trei celule. Fața internă a celulelor capcanei este sensibilă la atingere. Cînd un nematod încearcă să treacă prin structura inelară a capcanei, celulele sale se umflă brusc, mărindu-și de circa trei ori volumul inițial. Închiderea capcanei prin constricție activă este consecința unui răspuns thigmotrop (stereotrop sau haptotrop, adică un răspuns comportamental indus de un stimul de contact). Ea are la bază modificarea brutală a permeabilității celulelor respective, avînd drept urmare un influx brusc de apă în hife și extensia elastică a pereților acesteia. Cu timpul, materialul microfibrilar al acestora trece din lumen în regiunea inelară și deformarea celulelor umflate devine permanentă. Închiderea capcanei se realizează în ~ 1/10 secundă, capturînd nematodul care se agită violent pentru a scăpa. Final, celulele care formează inelul-capcană germinează, formează hife trofice care pătrund în corpul nematodelor, cresc, absorb complet conținutul acestora, după care sînt resorbite în miceliul parental. Moartea este determinată de leziuni mecanice, de epuizare consecutivă luptei pentru a scăpa și, probabil, unor toxine fungice (Pramer, 1964).

*Mecanismul „mecanic neconstrictiv"* utilizează capcane cu morfologie asemănătoare dar, cu diametru mai mic. Nematodele care încearcă să o străbată sînt imobilizate ferm și definitiv. După un timp scurt, celulele capcanei formează hife trofice, care pătrund în structura nematodului și îl omoară. Datorită agitației nematodelor care încearcă să scape, capcanele se desprind frecvent de miceliul parental, astfel că ele reprezintă și organe de dispersare a fungilor în natură.

*Mecanismul „adeziv"*, descris ca tipic pentru *Arthrobotrys oligospora*, este caracteristic fungilor la care din miceliul parental se formează scurte ramificații laterale ce se răsucesc în bucle primare semicirculare. Ele se anastomozează fie cu hifa parentală, fie cu altele laterale. Din ansele primare se formează altele secundare ș.a.m.d., pînă cînd rezultă o rețea complicată de anse orientate în direcții diferite (fig. 163). Buclele-capcană secretă un lichid lipicios grație căruia aderă în jurul nematodului ca o bandă adezivă înfășurată strîns în jurul degetului. Și în

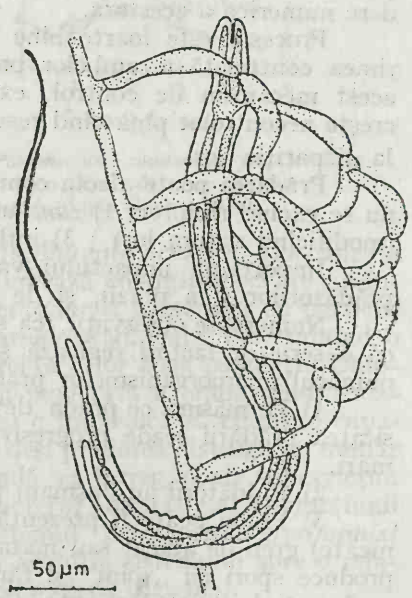



Fig. 163. — Reprezentarea schematică a modului de captare a unui nematod de către microfungi acvatici. În imagine, prădătorul este reprezentat de *Arthrobotrys oligospora* (după Rheinheimer, 1985).

acest caz apar hife mici care străbat cuticula pentru a forma în organismul nematodului structuri terminale ca niște bulbi („knobs", numite de Pramer 1964; „lethal lollipops"; engl. lollipop = bomboană, acadea), care absorb tot conținutul.

Fungii nematofagi sînt facultativ saprofiți. Ei se dezvoltă în sol independent și cresc în culturi pure în laborator, dar nu formează capcane. Apariția acestora este indusă de prezența nematodelor prin intermediul unui peptid cu g.m. mică produs de acestea, *nemina*.

**Semnificație ecologică.** Controlul biologic al nematodelor paraziți distructivi, importanți pentru agricultură, este intelectual atractiv, dar extrem de greu de realizat. Rezultatele obținute sînt echivoce, deoarece eficiența este condiționată de multiplicarea și activitatea fungilor în zona rizosferei.

**Fungii endozoici** reprezintă o formă particulară de parazitism. Prezenți în sol, în țesuturile vegetale sau animale în descompunere, ei își petrec întreaga fază vegetativă în corpul nematodelor.

Sporii pătrund pe cale orală sau prin adeziune de suprafața corpului, formează miceliul vegetativ, consumă tot conținutul, după care hifele fertile ies la suprafața carcasei pentru a forma o nouă generație de spori.

## SEMNIFICAȚIA ECOLOGICĂ A PRĂDĂRII

Prădarea, ca și parazitismul reprezintă un mod de control populațional în mediile naturale, deoarece determină reducerea populațiilor-gazdă și prin aceasta scad și resursele de nutrienți pentru prădători, ducînd la o scădere numerică a acestora.

Procesul este foarte bine reglat prin feedback negativ, asigurînd mărimea controlată a ambelor populații și împiedicînd eliminarea lor. Fără acest mecanism de control, exercitat de prădători, populațiile-pradă ar crește necontrolat pînă cînd resursele pentru creștere ar fi epuizate, ducînd la dispariția lor.

Prădarea poate afecta comunitățile de microorganisme pe trei căi care nu se exclud reciproc: 1) *cantitativ* (numărul microorganismelor); 2) *calitativ* (modificînd natura lor) ; 3) influențînd metabolismul acestora.

Importanța impactului variază în funcție de abundența relativă a prădătorilor și a prăzii, și de vulnerabilitatea acesteia (Alexander, 1971).

Numeroase observații, ca și unele cercetări experimentale demonstrează că o serie de factori reglează și limitează intensitatea prădării și respectiv numărul microorganismelor prădate, fără a le eradica:

1) Pe măsură ce prada devine mai rară și mai greu de procurat, intensitatea prădării scade progresiv, comparativ cu cea observată la densități mari.

2) Prădătorii au dușmani proprii, care le limitează activitatea.

3) Prada poate fi prezentă în forme de rezistență (spori, hife melanizate) greu de atacat sau inatacabile. Spre exemplu, *Entodinium caudatum* produce spori cu „spini" și fără, iar *E. vorax*, mai mare, prădător, atacă preferențial celulele fără spini. Cele cu „spini" scapă de prădare și se reproduc.

4) Regiunile depopulate prin prădare pot fi recolonizate cu microorganisme adiacente.

5) *Conceptul de refugiu:* numeroase observații demonstrează posibilitatea asigurării coexistenței sistemelor prădător/pradă, ca rezultat al hetero-

genității mediului care permite separarea parțială a celor două populații prin ocuparea unor nișe separate.

Gause (1934) a demonstrat experimental că într-un mediu foarte omogen, *Paramecium caudatum* (pradă) și *Didinium nasutum* (prădător) nu pot coexista datorită interacțiunilor interspecifice care determină distrugerea prăzii, favorizarea temporară a prădătorului care, final, dispare din lipsă de hrană (fig. 164). În medii heterogene, diversitatea habitatelor naturale asigură coexistența celor două specii pentru că microorganismele-pradă se pot refugia în microhabitate inaccesibile prădătorului.

Fenomenul este general: în natură, microorganismele cu capacitate limitată de a supraviețui unui stress fizic, chimic sau biologic pot coexista în timp, dar izolate în spațiu de microorganisme mai adaptate sau antagoniste, prezente în micrositusuri apropiate (fig. 164).

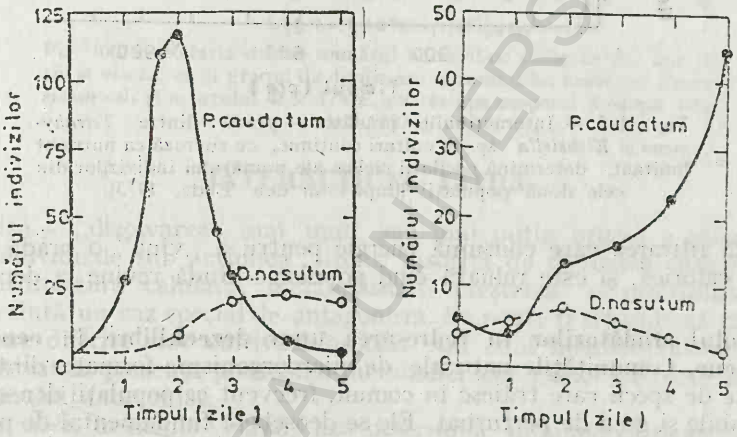



Fig. 164. — Supraviețuirea protozoarului *Paramecium caudatum*, pradă pentru *Didinium nasutum*, într-un mediu omogen, lipsit de orice refugiu (stînga) și într-un mediu heterogen (dreapta) (după Gause, 1934).

În natură există numeroase habitate (sedimente acvatice, flocoane în nămolul activ, porii mici din sol etc.), care creează condiții adecvate „refugierii" microorganismelor. De asemenea, interacțiunea bacteriilor cu particulele de argilă le apără de acțiunea protozoarelor-prădătoare, determinînd o încetinire a prădării, care favorizează coexistența celor două populații. Datorită acestor interacțiuni complexe, presiunea moderată a prădătorilor menține populația-pradă într-o stare dinamică și o împiedică să epuizeze capacitatea resurselor din mediu. În acest cadru, deși prădarea distruge un număr mare de organisme individuale, populația-pradă, ca întreg, poate supraviețui. Van den Ende (1973) scoate în evidență caracterul adaptativ al interacțiunii prădător—pradă. În culturi continue, în sistemul *Tetrahymena pyriformis/ Klebsiella pneumoniae*, acest caracter asigură evoluția sistemului spre o relație stabilă, care permite supraviețuirea ambelor specii (fig. 165).

Atlas și Bartha (1987) evidențiază și alte mecanisme de reglare. Astfel, protozoarele ciliate *(Paramecium, Vorticella, Stentor* ș.a.) își modifică comportamentul nutrițional pentru a da posibilitatea refacerii populației-pradă: cînd densitatea bacteriilor-pradă scade sub anumite limite ($10^5$—$10^6$/ml),

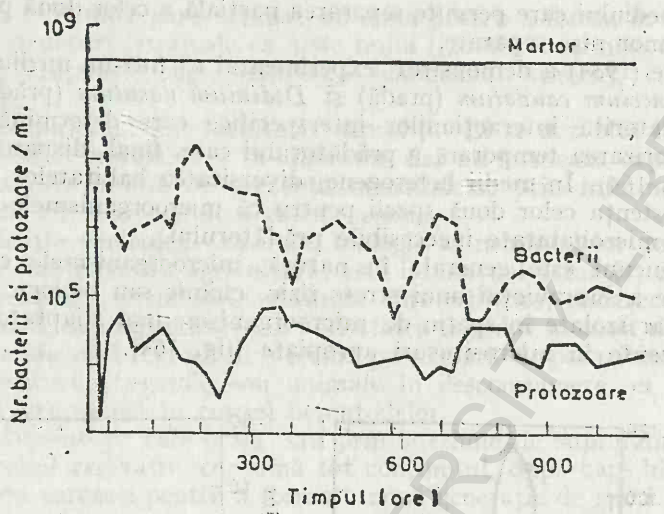



Fig. 165. — Interacțiunile prădător — pradă dintre *Tetrahymena* și *Klebsiella* sp. în culturi continue, cu zaharoză ca nutrient limitant, determină oscilații ciclice ale numărului indivizilor din cele două populații (după van den Ende, 1973).

încetează filtrarea care consumă energie pentru a „vîna" o pradă cu mică valoare calorică, și este reluată cînd populația-pradă revine la densități eficiente.

**Rolul prădătorilor în redresarea unor dezechilibre în ecosistemele microbiene.** Comunitățile naturale de microorganisme formate dintr-o mare varietate de specii care trăiesc în comun, frecvent ca populații dense, sînt relativ stabile și greu de perturbat. Ele se deosebesc fundamental de populațiile heterogene de plante sau animale, care, odată dezechilibrate, pot prezenta structura unor comunități modificate mai mult sau mai puțin permanent.

Microorganismele autohtone se opun cu fermitate dezechilibrului produs de tulburări ecologice temporare (ca, de exemplu, deversarea de ape reziduale în sol sau în apele naturale). În readucerea dezechilibrului la normal intervin, în mare măsură, procese homeostatice realizate de prădători.

Mitchell (1971) a demonstrat experimental că viteza și intensitatea declinului numeric al *E. coli* și fagului ΦX 174 în apa de rîu sînt corelate proporțional cu numărul bacteriilor indigene (fig. 166). După distrugerea *E. coli*, numărul prădătorilor *(Bdellovibrio*, bacterii litice, amiba *Vexillifera* etc.), temporar crescut, revine la normal.

Rolul prădătorilor este evident și în cazul apelor eutrofizate cu „înfloriri" algale. Activitatea microorganismelor prădătoare și a cianofagilor crește și acționează în special asupra populațiilor incapacitate fiziologic, cînd un nutrient devine limitant, restabilind echilibrul ecologic. Aceste date și altele numeroase demonstrează că microorganismele prădătoare reprezintă un component important al comunităților microbiene din ecosistemele naturale dezechilibrate, terestre sau acvatice. Ele reacționează ca reglatori homeostatici pentru a corecta dezechilibrele, restabilind condiția normală, echilibrată a mediilor respective.

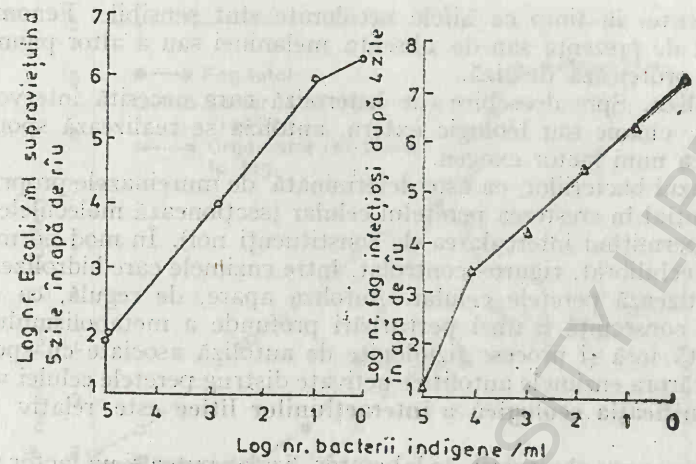



Fig. 166. — Relația dintre numărul bacteriilor indigene din apa de rîu și viteza, ca și gradul de diminuare a numărului bacterici *Escherichia coli* și a fagului $\Phi \times 174$ *E. coli* în apa respectivă (după Mitchell, 1971).

## INTERACȚIUNI LITICE

Liza — „dizolvarea" mai mult sau mai puțin bruscă a microorganismelor individuale sub acțiunea altora, însoțită de pierderea funcțiilor esențiale (arhitectura celulară, metabolismul, creșterea și multiplicarea etc.) — reprezintă un caz special de antagonism. Ea poate fi evidențiată cînd microorganisme diferite sînt cultivate asociat sau cînd microorganismul sensibil este cultivat în prezența produșilor metabolici sau a unor extracte ale microorganismului antagonist.

*In vitro*, în mediu lichid, liza determină diminuarea densității optice a culturilor, iar pe geloză, apariția unor „plaje de liză" datorită distrugerii peliculei de celule.

Microorganismele cu acțiune litică sînt foarte răspîndite în natură, fiind, în special, abundente în sol.

**Mecanismul lizei** este diferit în funcție de natura microorganismelor, dar are același substrat: modificarea brutală a structurii moleculare și a funcției învelișurilor celulare.

În cazul bacteriolizei au fost incriminate trei mecanisme:

1) sinteza și eliberarea de enzime mureinolitice de către antagonist, în cursul creșterii sale normale, care atacă structura de rezistență a peptidoglicanului;

2) producerea de antibiotice care interferă cu sinteza peretelui celular;

3) producerea de metaboliți toxici (în general, peptide) cu acțiune asupra peretelui celular.

Sensibilitatea la liză este diferită și prezintă, uneori, un anumit grad de selectivitate: un microorganism rezistent la acțiunea unei populații litice poate fi distrus de alta. În plus, în cazul unor microorganisme diferențiate, anumite stadii morfologice pot fi sensibile la liză, în timp ce altele sînt rezistente. Astfel, la *Helminthosporium victoriae*, conidioforii sînt rezistenți, iar hifele sînt sensibile. La *Alternaria solani*, hifele de culoare închisă și conidiile

sînt rezistente, în timp ce hifele necolorate sînt sensibile. Fenomenul este determinat de prezența sau de absența melaninei sau a altor pigmenți coloranți, care protejează de liză.

**Autoliza.** Spre deosebire de heteroliză care necesită intervenția unui agent fizic, chimic sau biologic extern, autoliza se realizează spontan, fără participarea unui factor exogen.

În cazul bacteriilor, ea este determinată de mureinazele proprii, care au un rol esențial în creșterea peretelui celular (secționează moleculele de peptidoglican, permițînd intercalarea de constituenți noi). În mod normal, există un raport echilibrat, riguros controlat, între enzimele care hidrolizează și cele care sintetizează peretele celular. Autoliza apare, de regulă, ca un proces patologic, consecință a unei perturbări profunde a metabolismului celular.

Există însă și procese fiziologice de autoliză asociate cu sporogeneza, în cursul cărora enzimele autolitice activate distrug peretele celulei vegetative.

**Semnificația ecologică a interacțiunilor litice** este relativ puțin cunoscută.

Pe baza unor observații de laborator, liza ar putea fi un factor important pentru reglarea populațiilor competitoare, pe care, uneori, le poate elimina. În cazurile în care interacțiunile litice sînt foarte intense, în anumite habitate, constituenții celulelor lizate pot fi utilizați ca nutrienți de către microorganismele asociate.

În cazul microorganismelor patogene pentru animale sau plante, rezistența la liză, asociată, uneori, cu structuri specifice (spori) care le asigură persistența în natură este deosebit de importantă pentru agricultură, zootehnie și medicină.

## LIZA FAGICĂ

Bacteriofagii sînt larg răspîndiți în natură, fiind găsiți practic în toate mediile în care se găsesc bacteriile-gazdă*. Numărul fagilor prezenți extracelular în sol este foarte variabil și greu de cuantificat, dar este apreciat, în general, ca foarte mare. Fagii virulenți, litici pot avea un rol important în reglarea densității diferitelor populații de microorganisme (fig. 167).

Numeroase date demonstrează că în natură, cei mai mulți fagi există în stare de profag, în bacteriile lizogene. Unele specii, ca, de exemplu, *Pseudomonas aeruginosa* sînt lizogene în natură în 100% din cazuri, iar, uneori, chiar polilizogene, putînd purta pînă la opt genomuri fagice. Această stare are o importanță ecologică cu totul deosebită. Ea reprezintă, în primul rînd, o strategie de „supraviețuire" a fagilor cu posibilitatea reluării ciclului de replicare, în special în mediile în care multiplicarea bacteriilor este limitată de diferite influențe nefavorabile (lipsa nutrienților, prezența unor substanțe toxice, frig etc.).

Fagii temperați transductori reprezintă, în același timp, agenți de variabilitate bacteriană, prin capacitatea lor de a determina prin transducție genetică transferul de informație cromosomală în populațiile bacteriene mari și concentrate în spațiu. În mediile cu populații rare sau dispersate (cum este solul în stare de repaus), potențialul de transfer genetic este foarte limitat.

S.A.Sturdza (1968), pe baza analizei cercetărilor științifice românești referitoare la prezența fagilor în mediul extern, confirmă importanța feno-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală;* vol. I, p. 210 și vol. III, p. 437.

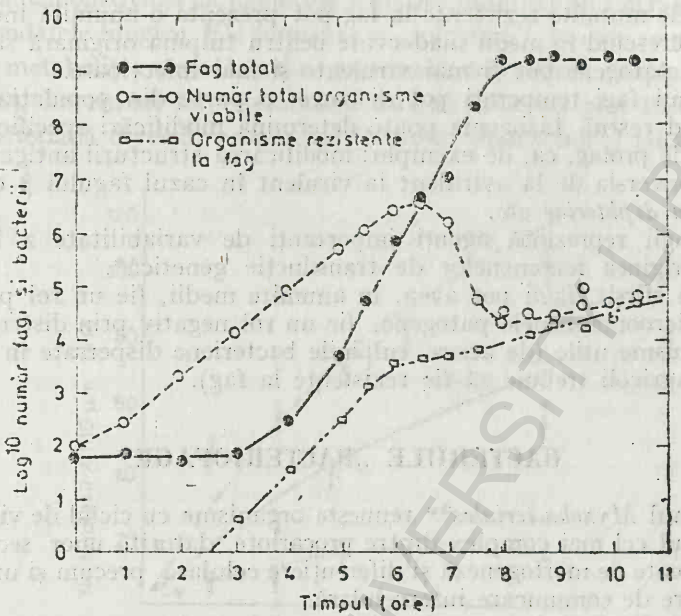



Fig. 167. — Creșterea bacteriei *Salmonella typhi* (Vi—A) și a fagului său, în amestec, după un inoculum mic. Inițierea multiplicării fagului este foarte evidentă cînd populația bacteriană a ajuns la $10^4$ — $10^5$ celule/ml, iar efectele sale litice apar cînd bacteriile ating densitatea de $10^6$ celule/ml. Final, se obține un amestec de bacterii sensibile și rezistente la fag (după Anderson, 1957).

menelor de lizogenie pentru menținerea fagilor în natură și adaugă următoarele concluzii importante:

1) Fagii liberi dispar după scurt timp în mediile naturale datorită la trei cauze: a) prin efectul sedimentării; b) prin activitatea protozoarelor care consumă bacteriile purtătoare de fagi; c) sub acțiunea radiațiilor UV solare în straturile superioare ale apelor.

2) Fagii sedimentați se pot menține vreme îndelungată în apele reziduale, în depozitele de nămol, probabil, mai ales, ca profagi în bacteriile lizogene. Ei pot fi eventual repuși în circulație prin aceste sedimente.

3) În cursul proceselor naturale de epurare bacteriologică a solului și a apelor, cel puțin în climatul nostru, titrul fagilor scade progresiv pînă la dispariție. Este probabil că în liza bacteriilor-gazdă, liza fagică nu are un rol esențial.

## Rolul fagilor în ecologia microorganismelor

Prezența fagilor în natură poate influența evoluția populațiilor bacteriene pe mai multe căi, mai ales în mediile în care aceștia se găsesc în număr mare, ca, de exemplu, în apele uzate ($10^3$—$10^6$/ml), în anumite tipuri de sol etc.:

1) Prin eliminarea tulpinilor sensibile la fag și înlocuirea lor cu mutante rezistente, diferite ca potențialități ecologice față de tulpinile originare.

Astfel, unele mutante rezistente la fag pot prezenta o anumită independență nutritivă, crescînd în medii inadecvate pentru tulpina originară sau în cazul bacteriilor patogene pot fi mai virulente și mai infecțioase.

2) Unii fagi temperați pot distruge o parte din populația originară, lizogenizînd restul. Lizogenia poate determina modificări specifice, asociate cu starea de profag, ca, de exemplu: modificarea structurii antigenice a bacteriilor, conversia de la avirulent la virulent în cazul fagului β de la *Corynebacterium diphteriae* etc.

3) Fagii reprezintă agenți importanți de variabilitate a bacteriilor, fiind la originea fenomenelor de transducție genetică*.

4) În sfîrșit, fagii pot avea, în anumite medii, fie un rol pozitiv, distrugînd microorganismele patogene, fie un rol negativ prin distrugerea unor microorganisme utile (de aceea, tulpinile bacteriene dispersate în sol ca fertilizatori agricoli trebuie să fie rezistente la fag).

## BACTERIILE „BACTERIOFAGE"

Ordinul *Myxobacteriales*** reunește organisme cu ciclul de viață și comportamentul cel mai complex dintre procariote, datorită unor secvențe relativ complicate de morfogeneză și diferențiere celulară, precum și unor procese rudimentare de comunicare intercelulară.

Răspîndite în sol și pe substanțe vegetale în descompunere, mixobacteriile au capacitatea de a face hidroliza unor macromolecule insolubile sau greu solubile (celuloză, peptidoglican, amidon etc.) și de a folosi constituenții lor pentru creștere. Unele sînt bacteriotrofe și au proprietatea de a omorî și liza bacteriile și, uneori, și alte microorganisme (levuri, mucegaiuri, alge) înainte de a hidroliza constituenții din structura lor.

Unii cercetători consideră mixobacteriile ca microprădătoare, deoarece omoară, lizează unele microorganisme și se hrănesc cu substanțele eliberate. Totuși, caracterul de prădător este discutabil, deoarece efectul lor (distrug celulele bacteriene întregi cu ajutorul enzimelor extracelulare) este rezultatul unui efort de grup, colonial, și nu o acțiune individuală. Într-adevăr, după cum remarcă Dworkin (1973), mixobacteriile prezintă un tip rudimentar de organizare „multicelulară" sau, mai corect, de *asociere comunitară*, reprezentînd cea mai simplă și mai primitivă *comunitate biologică organizată*. Asocierea caracterizează toate stadiile de viață: celulele se deplasează adesea în „roiuri" coordonate, care pulsează ritmic sau se mișcă coordonat.

Capacitatea lor de a distruge bacteriile sau alte microorganisme ar avea o semnificație deosebită, contribuind la reglarea densității acestora într-un mediu natural.

**Bacteriile care lizează fungii.** Frecvente în sol, bacteriile „hifolitice" colonizează hifele fungice și sporangiile, formînd grămezi fine, reunite, uneori, de mucus, pe suprafața acestora. Ele determină leziuni ale pereților celulari urmate de liză, apreciată prin absența citoplasmei, pe microelectronografii sau după coloranți de anilină. Experimental s-a demonstrat că numărul bacteriilor este mai mare pe hifele vii decît pe suporturi neutre (fibre de sticlă) și este maxim pe hifele lizate (fig. 168).

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 381.

** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 393.

Aceasta demonstrează că bacteriile specifice hifolitice sînt atrase chimiotactic de exsudatele fungice. Ele formează o „hifosferă", în care se multiplică și eliberează metaboliți extracelulari ce determină degradarea citoplasmei fungice (fig. 169). La rîndul lor, metaboliții fungici eliberați prin liză atrag o populație bacteriană diversă, nespecifică (Nesbitt, Malajczuk și Glenn, 1978).

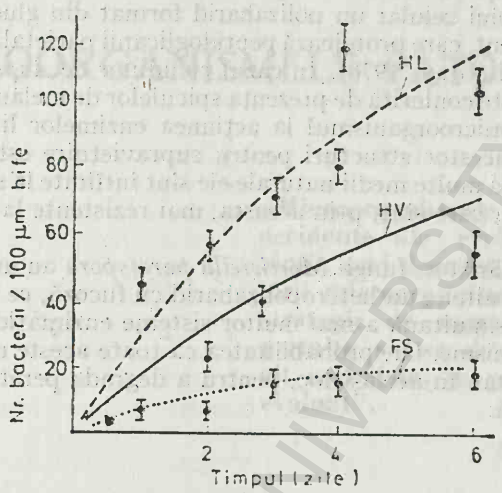



Fig. 168. — Bacteriile care lizează fungii se leagă mai activ de hifele vii (HV) decît de un substrat inert cum sînt fibrele de sticlă (FS); HL = hife lizate. Barele verticale marchează erorile standard (după Nesbitt, Malajczuk și Glenn, 1978).

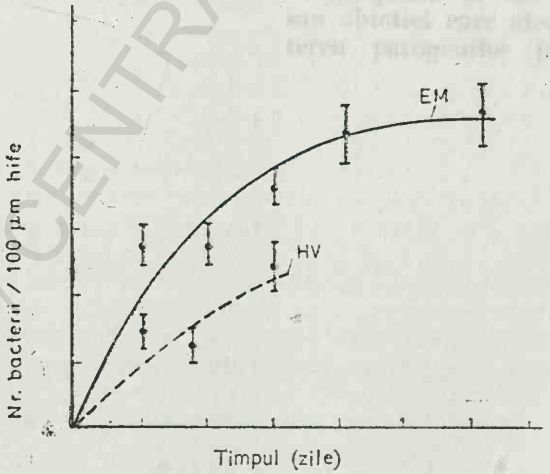



Fig. 169. — Bacteriile care lizează fungii colonizează diferit hifele vii (HV) și extremitățile lor moarte (EM). Barele verticale marchează erorile standard (după Nesbitt, Malajczuk și Glenn, 1978).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

## Adaptări structurale și biochimice pentru rezistența la liză

Prezența în sol a numeroase enzime și microorganisme litice a determinat evoluția unor adaptări menite să asigure rezistența la liză a microorganismelor, care supraviețuiesc îndelungat, datorită metabolismului endogen lent sau rezervelor de substanțe cu valoare energetică. Astfel, *Arthrobacter globiformis* are în structura peretelui celular un polizaharid format din glucoză, galactoză și ramnoză lizorezistent, care protejează peptidoglicanii parietali, fie acoperindu-i, fie legîndu-se de ei (Gray, 1976). În cazul conidiilor de *Aspergillus phoenicus*, rezistența la liză este conferită de prezența spiculelor de melanină. Îndepărtarea lor sensibilizează microorganismul la acțiunea enzimelor litice.

Importanța acestor structuri pentru supraviețuire este reflectată și de faptul că în cele mai multe medii naturale ele sînt întîlnite la speciile dominante de microorganisme, care sînt, prin aceasta, mai rezistente la auto- sau heteroliză (Gray, 1976).

În mod asemănător, fungii *Mortierella parvispora* au un perete complex, care conține, între altele, un heteropolizaharid cu fucoză, ce nu poate fi atacat decît de acțiunea simultană a mai multor sisteme enzimatice, provenite de la diferite microorganisme. Or, probabilitatea ca toate aceste microorganisme să fie prezente simultan în același loc, pentru a degrada peretele celular fungic, este foarte redusă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY

# MICROORGANISMELE PATOGENE

„Microorganismele patogene nu sînt accidente ale evoluției. Ele reprezintă, mai degrabă, rezultatul adaptării microorganismelor la o anumită strategie de supraviețuire, care le permite să se dezvolte pe sau în alt organism, în general, mult mai evoluat".

B. Brett-Finlay
S. Falkow

„Răspîndirea unei boli în populațiile animale este un proces ecologic dependent de proprietățile biologice ale agentului etiologic, ale organismului-gazdă și de factorii biotici sau abiotici care afectează transmiterea patogenilor între gazde".

R. M. Atlas
R. Bartha

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# MICROORGANISMELE PATOGENE

**„Bacteriile patogene au un întreg arsenal de arme, care le permit să invadeze un organism-gazdă și să producă boala. Problema este de a identifica armele din acest arsenal, importanța lor relativă, natura lor chimică și modul de acțiune asupra gazdei".**

H. SMITH

Dintre nenumăratele specii de microorganisme existente în natură numai un număr limitat sînt capabile să se dezvolte în asociație cu organismele superioare, iar dintre acestea, un număr și mai restrîns (aproximativ cîteva sute) sînt patogene. Microorganismele patogene sînt perfect adaptate pentru a coloniza și a se dezvolta în nișa ecologică reprezentată de gazda lor, uneori specifică, și, în același timp, pentru a competiționa și supraviețui în perioadele de existență în afara gazdelor (în apă, alimente, aer, sol, vectori vii etc.).

Este evident că patogenitatea este rezultatul adaptării de-a lungul evoluției pentru o anumită gazdă prin acumularea de modificări succesive realizate prin mutații, transfer de gene și selecție. Ea implică existența în structura genetică a patogenilor a unor gene localizate pe cromosomi, pe plasmide și uneori chiar în genomul unor fagi, care le permite să infecteze celulele sau organismele-gazdă și să competiționeze cu mecanismele specifice și nespecifice ale imunității, care în mod normal creează un mediu ostil agenților patogeni. Patogenitatea microorganismelor este legată, în general, în mod inexact de parazitismul lor, deși cele două proprietăți nu sînt superpozabile. Este adevărat că cele mai multe bacterii patogene sînt parazite și facultativ saprofite, deoarece se dezvoltă *in vitro* pe medii organice în laborator.

Există și microorganisme riguros saprofite, cum este, spre exemplu, *Clostridium botulinum*, care nu se poate dezvolta în organism, dar care poate fi patogen, în mod indirect, printr-un produs al metabolismului său, exotoxina botulinică. Este probabil că, în anumite condiții (în special la indivizii compromiși imunologic), orice microorganism care are capacitatea de a se menține într-un organism — inclusiv cele care formează microbiota normală— poate produce, ocazional, boala acționînd ca „oportuniști".

Bacteriile patogene au două proprietăți caracteristice: *patogenitatea și virulența*. Deși în prezent există tendința de a folosi cei doi termeni ca sinonimi, în lucrarea de față ei sînt descriși în mod diferențiat pentru rațiuni pe care le considerăm ca evidente după parcurgerea textelor respective. Anticipînd, putem spune că un microorganism este patogen dacă are potențial capacitatea de a produce boala, dar nu o face decît dacă este suficient de virulent pentru a pătrunde în organismul-gazdă și pentru a depăși reacțiile de apărare ale acestuia.

## PATOGENITATEA

Termen discutabil din punct de vedere semantic, patogenitatea, proprietatea esențială a oricărui agent infecțios, definește aptitudinea lui de a determina, în mod natural sau în condiții experimentale, apariția unui proces

infecțios (persistența sau multiplicarea *pe* sau *în* organismul gazdei), de obicei decelabil din punct de vedere clinic, respectiv capacitatea lui de a produce boala la o anumită gazdă receptivă.

*Infecția* (L. inficere = a otrăvi, a deteriora) este capacitatea agentului patogen de a se localiza și multiplica în organism suficient pentru a asigura stabilirea în gazdă prin colonizarea tranzitorie sau pe termen lung și pentru a asigura transmiterea cu succes la o gazdă nouă sensibilă. Poate fi, uneori, inaparentă sau poate avea o evoluție asociată cu perturbarea stării normale de sănătate a organismului-gazdă și cu fenomene de disconfort corespunzînd unei *boli infecțioase*.

Infecția și boala sînt rezultatul interacțiunii dintre microorganismele patogene și organismele-gazdă și, în consecință, apariția și evoluția lor sînt dependente de ambele entități.

*Patogenitatea este un caracter de specie.* Ea a apărut în procesul de evoluție și constă în însușirea potențială a speciei respective de a infecta și de a produce îmbolnăvirea organismelor receptive. De aceea, unele organisme *(Bacillus anthracis, Corynebacterium diphteriae, Salmonella typhi, Mycobacterium tuberculosis)* sînt patogene, chiar dacă unele tulpini ale speciilor respective nu produc boala decît dacă sînt inoculate în doze foarte mari sau dacă organismul-gazdă are o rezistență generală foarte scăzută. În schimb, altele, ca *Azotobacter, Nitrobacter, Acetobacter* etc., sînt totdeauna nepatogene datorită incapacității de a se stabili și de a se multiplica într-un organism vegetal sau animal.

Patogenitatea implică existența a patru proprietăți esențiale:

1) capacitatea de a pătrunde și de a se localiza în organismul gazdei;

2) multiplicarea în țesuturile acesteia (și eventual producerea de toxine) și/sau invadarea acestora;

3) capacitatea de a rezista mecanismelor de apărare ale gazdei sau de a nu determina declanșarea acestora;

4) producerea de leziuni care, eventual, se exteriorizează prin simptome de boală.

Este evident că apariția bolii infecțioase este condiționată de dotarea agenților patogeni cu toate aceste calități care, la rîndul lor, sînt, fiecare, condiționate de procese complexe a căror însumare este esențială pentru obținerea efectului final global. Lipsa sau deficiența unora din factorii care asigură fiecare din aceste etape determină o atenuare, uneori considerabilă, a tulpinii respective.

Adaptarea unui microorganism patogen pentru om, animale sau plante nu implică un grad foarte ridicat de patogenitate, pentru că tocmai tulpinile patogene, care determină o mortalitate foarte mare printre organismele infectate, supraviețuiesc mai greu în natură și, de aceea, diseminarea lor este limitată și uneori chiar încetează complet. Din acest punct de vedere, agenții patogeni cei mai bine adaptați pentru a supraviețui sînt cei care provoacă infecții ușoare, cu un mare procent de îmbolnăviri subclinice și cei care creează o imunitate slabă și de scurtă durată.

## VIRULENȚA

„Galaxia determinanților virulenței include factori asociați celulelor lor cum sînt capsula, adezinele fimbriene, proteinele membranei externe, precum și enzime extracelulare și exotoxine".

J. P. ARBUTHNOTT

În prezent nu există o definiție unanim acceptată a virulenței. Considerăm că o formulare care prezintă cel mai realist conceptul de virulență este cea care se referă la capacitatea unei tulpini date a unui microorganism patogen, aflată într-o anumită fază de creștere, de a se localiza, de a coloniza, de a se multiplica și, eventual, de a invada celulele și țesuturile organismului-gazdă și de a produce toxine, determinînd o stare patologică la o anumită gazdă, atunci cînd este introdusă în organismul acesteia în condiții bine definite. Această definiție ecologică precizează relația obligatorie dintre particularitățile parazitului și cele ale gazdei în determinarea bolii, ca și a gradului ei de gravitate.

Rezultantă a interacțiunii unor elemente care țin atît de parazit, cît și de gazdă, virulența este, deci, o proprietate multifactorială, care exprimă *cantitativ* gradul de patogenitate al unei tulpini pentru o anumită gazdă și este determinată de însumarea unor însușiri diferite și independente, cum sînt capacitatea de infecțiozitate, de invazie și de toxigenitate. Datorită acestor însușiri, agentul patogen poate să reziste mecanismelor de apărare celulare și humorale ale gazdei, care îl atacă imediat după ce a pătruns în țesuturi, și este capabil să se adapteze, să se multiplice și să determine tulburări patologice care duc la apariția stării de boală. În cazul microorganismelor foarte virulente, o singură celulă bacteriană capabilă să se multiplice poate produce o infecție letală. Cel mai frecvent însă, este necesar un număr mare de celule pentru a depăși reacțiile de apărare ale gazdei, pentru a elabora toxine și alte produse care pot produce o îmbolnăvire cu sfîrșit letal.

Spre deosebire de patogenitate, *virulența nu este o proprietate de specie, ci una individuală, de tulpină*. Această proprietate este variabilă nu numai de la o tulpină la alta, ci, în timp, chiar la aceeași tulpină. În plus, diferitele proprietăți ale organismului care condiționează virulența lui pot suferi variații independente unele de altele. Din aceasta decurge necesitatea măsurării ei cît mai exacte.

### MĂSURAREA VIRULENȚEI

Considerată sub raportul infecțiozității sau al toxicității, virulența bacteriilor se aprecia inițial în funcție de cantitățile minime de bacterii sau de toxină capabile să producă moartea animalelor la care erau administrate. Ea se exprimă prin doza minimă letală (DML), care reprezintă cantitatea minimă de bacterii (sau de toxină) ce produce infecția (sau intoxicația) și moartea tuturor animalelor receptive, raportată la o anumită specie animală, cu o greutate standard și la o anumită perioadă de timp. Pentru a preîntîmpina erorile legate de

rezistența individuală variabilă, determinările se fac pe loturi mai mari de animale (de regulă 10) și se exprimă prin $DL_{50}$ („Lethal dose"), care reprezintă cantitatea minimă de microorganisme (sau de toxină) ce determină moartea a 50% din animalele inoculate (fig. 170).

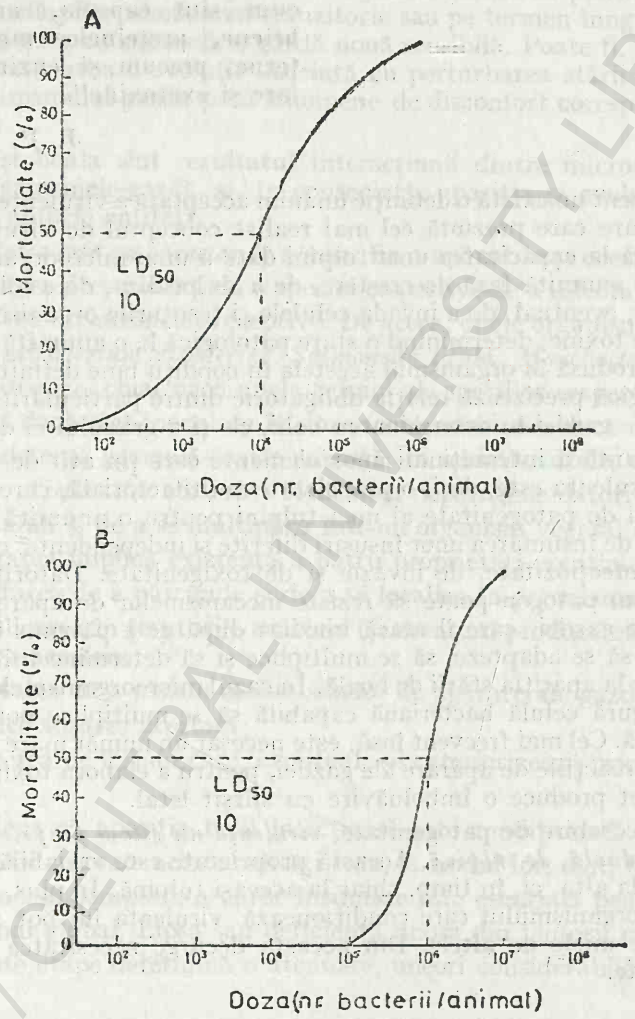



Fig. 170. — Determinarea $DL_{50}$ în raport cu numărul bacteriilor care omoară 50% dintr-un lot de cel puțin 10 animale după un interval de timp standard. Tulpina A este de 100 de ori mai virulentă decît tulpina B.

Figura 171 prezintă sintetic raționamentul principal al superiorității determinării DL 50 în raport cu DLM.

În cazurile în care moartea animalului nu poate fi folosită drept criteriu al virulenței se pot lua în considerare alte efecte patologice care pot fi corelate cu doza de bacterii necesară pentru a determina apariția lor la 50% din anima-

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lele inoculate: de exemplu, virulența poate fi exprimată prin doza infecțioasă 50% ($DL_{50}$), care reprezintă cantitatea de bacterii necesară pentru a produce infecția, în condițiile amintite.

Virulența microorganismelor este variabilă, atît în condiții naturale, cît și în condiții de laborator. Ea poate fi pierdută, spre exemplu, în urma unei mutații. Un exemplu tipic mult studiat este cel de la *Streptococcus pneumoniae*.

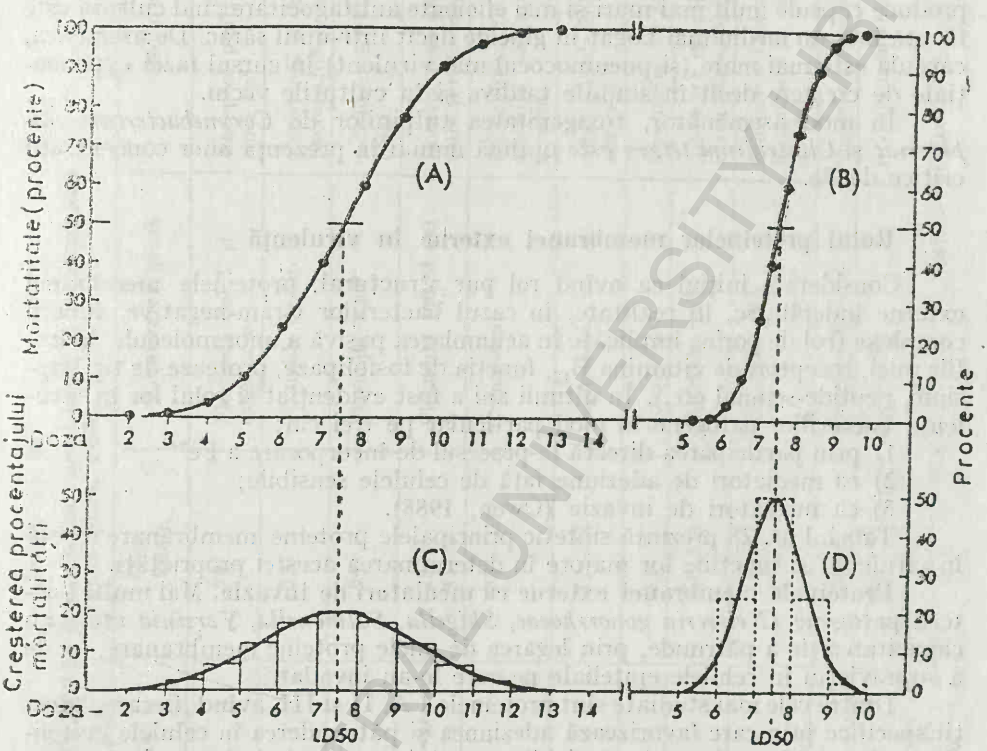



Fig. 171. — Măsurarea efectelor letale ale unei toxine bacteriene ($DL_{50}$), după un interval de timp standard, de la inocularea unor doze variabile la cîte un grup de cel puțin 10 animale de laborator (după Wilson și Miles, 1964).

Varianta S (celulele încapsulate) are o virulență mare pentru șoarece spre deosebire de celulele mutante, care sînt repede atacate de fagocite și distruse*. Există, de asemenea, posibilitatea reversiei R→S. În populațiile mixte de pneumococi, care conțin atît celule R, cît și celule S, primele sînt distruse, iar celulele S se multiplică, producînd, de regulă, infecții septicemice și moartea șoarecelui. Din sîngele acestuia se izolează, prin hemocultură, exclusiv celule S. Din acest exemplu rezultă faptul că virulența sau avirulența sînt proprietăți biologice corelate cu anumite caractere de structură, de compoziție chimică sau de cultură ale bacteriilor respective. Evident, capsula *per se* nu este un factor direct de virulență, ci prin capacitatea de a conferi rezistența la fagocitoză. În felul acesta, formarea capsulei apare mai degrabă ca un meca-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 341.

nism de apărare a bacteriei decît ca un indiciu al agresivității ei, deoarece polizaharidele capsulare nu sînt dăunătoare nici pentru fagocite și nici pentru alte tipuri de celule.

**Variațiile fenotipice ale virulenței.** Puterea de invazie, ca și toxigeneza bacteriilor pot fi modificate ca rezultat al unor modificări metabolice determinate de anumiți factori de mediu. Astfel, s-a demonstrat că *S. pneumoniae* produce capsule mult mai mari și mai eficiente antifagocitare cînd cultura este făcută într-un mediu mai bogat în glucide decît într-unul sărac. De asemenea, capsula este mai mare (și pneumococul mai virulent) în cursul fazei exponențiale de creștere decît în stadiile tardive și în culturile vechi.

În mod asemănător, toxigenitatea tulpinilor de *Corynebacterium diphteriae* și *Clostridium tetani* este optimă numai în prezența unor concentrații critice de Fe.

## Rolul proteinelor membranei externe în virulență

Considerate inițial ca avînd rol pur structural, proteinele membranei externe îndeplinesc, în realitate, în cazul bacteriilor Gram-negative, funcții complexe (rol de porine implicate în acumularea pasivă a unor molecule hidrofile mici, receptori de vitamina $B_{12}$, funcția de fosfolipaze, proteaze de tip tripsinic, peptide-semnal etc.). În ultimii ani a fost evidențiat și rolul lor în virulența bacteriilor patogene în mod particular pe trei căi:

1) prin participarea directă la procesul de încorporare a $Fe^{3+}$;
2) ca mediatori de adeziune față de celulele sensibile;
3) ca mediatori de invazie (Owen, 1988).

Tabelul nr. 28 prezintă sintetic principalele proteine membranare cu rol în virulență și funcțiile lor majore în determinarea acestei proprietăți.

**Proteinele membranei externe ca mediatori de invazie.** Mai multe bacterii patogene *(Neisseria gonorrhoeae, Shigella, Salmonella, Yersinia* etc.) au capacitatea de a pătrunde, prin legarea de unele proteine membranare, și de a supraviețui în celulele epiteliale pe care le-au invadat.

Dintre cele mai studiate sînt proteinele I A, II și III, avînd ,fiecare, funcții specifice prin care favorizează adeziunea și pătrunderea în celulele epiteliale, rezistență la acțiunea bactericidă a serului etc., conferind capacitatea de a produce infecții diseminate.

Proteine similare au fost descrise și la alte bacterii patogene, în special la *Shigella* și *Escherichia coli*, enteroinvazina avînd rol în încorporarea $Fe^{3+}$, adeziunea de celulele epiteliului intestinal, capacitatea de a invada și de a supraviețui în celulele epiteliale, rezistența la fagocitoză etc.

## Rolul peptidoglicanilor

Componenți caracteristici ai peretelui celular bacterian, reprezentînd 80—90% din greutatea uscată a acestuia la bacteriile Gram-pozitive și numai 2,5—10% la cele Gram-negative, peptidoglicanii au, pe lîngă rolul lor fundamental structural*, o contribuție importantă în inițierea unor fenomene patologice.

Experimental s-a demonstrat că fragmentele mici (g.m. 5,3 × $10^6$ dal) de perete celular induc artrite acute, în timp ce fragmentele de zece ori mai mari

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 310.

*Tabelul nr. 28*

**Principalele proteine de membrană externă implicate în patogenitate**
(după Owen, 1988).

| Bacteria | Proteina | G.m. (kdal) | Localizarea genei | Rolul în virulență |
|---|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | Iut A | 74 | Plasmida Col V și cromosom | Receptor pentru înglobarea aerobactinei $Fe^{3+}$. |
| | Tra T | 25 | Plasmide de tip F | Rezistență la fagocitoză și la acțiunea bactericidă a serului |
| | EAF | 94 | Plasmida EAF | Aderiune EPEC de epiteliul intestinal. |
| *Shigella flexneri* și EIEC | Ipa A–D | 78,57, 43,39 | Plasmidă 140 M dal | Invazia țesutului epitelial; supraviețuire intracelulară. |
| *Neisseria gonorrhoeae* | P. IA | 32 – 39 | Cromosom | Pătrunderea în celulele epiteliale; rezistență la acțiunea bactericidă a serului. |
| | P. II | 27–32 | Cromosom | Aderiune de celule epiteliale; variație antigenică. |
| | P. III | 31 | Cromosom | Producere de anticorpi blocanți. |
| *Yersinia enterocolitica* | $YOP_1$ | 160(47) | Plasmida pYV | Aderență de celulele epiteliale; inhibarea fagocitozei. |
| | $YOP_{2-5}$ | 51,40, 35,25 | Plasmida pYV | Inhibarea fagocitozei Rezistență la acțiunea bactericidă a serului. |
| *Borrelia hermsii* | VMP | 20–40 | Plasmide lineare | Variație antigenică. |
| *Y. pseudotuberculosis* | Inv | 103 | Cromosom | Invazia celulelor epiteliale. |

Abrevieri: EIEC – „Entero-Invasive *E. coli*"; EAF – „Entero-Adhesive factor"; EPEC – „Entero-Pathogenic *E. coli*"; YOP – „*Yersinia* outer membrane protein"; VMP – „variabile major protein".

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

induc artrite cronice cu debut tardiv. Fragmentele cu dimensiuni intermediare induc ambele tipuri de artrite.

Pe baza datelor acumulate în ultimul deceniu, peptidoglicanii exercită acțiuni complexe în cursul infecțiilor bacteriene, care includ: efect artritogen, pirogenitate, stimularea producerii de IL-1, stimularea fagocitozei, efecte somnogene și mitogene, inducția producerii de colagenază și prostaglandine, sinteză de interferoni (Doyle și Sonnenfeld, 1989).

### Rolul moleculelor amfifile de pe suprafața celulelor bacteriene

Moleculele amfifile de pe suprafața bacteriilor (antigenul polizaharidic de pe suprafața celor mai multe *Enterobacteriaceae*, lipopolizaharidele bacteriilor Gram-negative, lipoproteinele legate de peptidoglican la cele Gram-pozitive) și acizii lipoteichoici pot juca un rol important în patogenitate.

**Lipopolizaharidele** își datorează efectele biologice lipidului A (vezi capitolul *Endotoxinele bacteriene)*. Acestea includ pirogenitatea, leucopenia urmată de leucocitoză, creșterea activității enzimelor lizosomale, agregarea plachetelor sanguine, starea de șoc etc.

**Acizii lipoteichoici** activează sistemul complement, au efect mitogen și antigenic, activează macrofagele, inhibă sinteza autolizinelor bacteriene, aderă de hematii și de alte tipuri de celule.

### Rolul flagelilor în virulență

Considerați inițial ca simple organite de locomoție, flagelii au, în realitate, un rol mult mai complex în biologia celulei bacteriene prin:

1) funcția de stimulare a adeziunii de diferite epitelii;

2) capacitatea de a facilita pătrunderea prin stratul de mucus ce acoperă țesuturile epiteliale;

3) funcția de orientare chemotactică, aero-, fototactică etc., cu semnificație ecologică generală și implicînd structuri și mecanisme subtile corelate cu un cost biosintetic semnificativ în termeni de energie și cu participarea a $\sim$ 60 de gene (Macnab, 1987).

Rolul lor în virulență este controversat, deși, după Brubaker (1985), capacitatea bacteriilor patogene de a-și modifica poziția în spațiu prin mobilitate activă este de importanță esențială pentru virulență.

Rolul flagelilor în virulență a fost studiat, în special, cu ajutorul mutantelor neflagelate, sau, mai ales, al mutantelor comportamentale „neinteligente" (celule flagelate, respectiv cu un sistem flagelar morfologic normal, dar cu defecte în sistemul de transducție a energiei sau cu flageli care se rotesc, dar prezintă anomalii de răspuns chemotactic. Aceste anomalii sînt de trei tipuri: 1) mutante, în general, nechemotactice; 2) răspuns chemotactic semispecific, defectiv la o serie de stimuli sau 3) răspuns chemotactic specific (răspund numai la un set restrîns de stimuli). Datele experimentale, deși relativ limitate demonstrează, fără echivoc, importanța deosebită a asocierii răspunsului chemotactic cu mobilitatea, ca determinanți ai virulenței bacteriilor.

Mutantele neflagelate sau flagelate, dar nechemotactice de *Salmonella* sp. și *Campylobacter jejuni* colonizează mai greu suprafața epiteliilor decît cele mobile și chemotactice.

În cazul bacteriei *Pseudomonas aeruginosa* s-a demonstrat că tulpinile mobile care infectează arsurile sînt mai virulente decît cele imobile. În plus, varianta mobilă a bacteriei ar forma biofilme la nivelul țesutului pulmonar al bolnavilor de fibroză chistică, după mecanismul descris de Costerton (1978) pentru mediile naturale acvatice (biofilm alcătuit din microcolonii bacteriene, acoperite de o matrice exopolizaharidică de la marginile căreia se eliberează celule foarte mobile care invadează țesutul sănătos).

La *Vibrio cholerae* s-a demonstrat răspîndirea mai largă a celulelor mobile și pătrunderea lor mai profundă în vilozități, condiționată însă de existența unui gradient de atractant. În lipsa acestuia, bacteriile rămîn fixate la situsul inițial de adeziune. După Booth (1986), în adeziunea *V. cholerae* de celule un rol esențial ar reveni tecii care acoperă flagelul unic polar.

După Brubaker (1985), mobilitatea, în general, ar fi un factor important pentru virulență. Astfel, capacitatea de deplasare rapidă în medii vîscoase cum sînt cele din organism, observată la *Borrelia, Leptospira* și *Treponema*, ar fi un factor esențial pentru evitarea fagocitozei în așa fel încît leucocitele le pot captura doar cu mare dificultate.

De asemenea, la *Mycoplasma* sp. infecțiozitatea pare să fie dependentă de capacitatea lor de a se deplasa prin alunecare, de a pătrunde prin stratul de mucus și de a ajunge astfel în apropierea receptorilor de adezine.

Flagelii ar participa și în mărirea capacității de invazie la *Escherichia coli* uropatogenă, în cursul infecțiilor ascendente, contra curentului de scurgere a urinei. Mecanismul este complex și ar include: 1) rolul mobilității în mărirea șanselor de contact cu suprafețe de legare; 2) aderența de uromucoid; 3) învingerea barierelor de repulsie electrostatică între suprafețe cu sarcini similare.

Cu toate aceste fapte absolut concrete, concluzia generală este totuși că, în absența chemotaxiei mobilitatea *per se* reprezintă un avantaj minor pentru virulența bacteriană (Smith, 1988).

### Rolul IgA proteazelor în virulență

Bacteriile patogene care colonizează mucoasele au, în general, proprietatea de a elabora enzime extracelulare cu ajutorul cărora contracarează efectul protector al anticorpilor sIgA (McNabb și Tomasi, 1981). Aceste enzime sînt proteaze specifice pentru subclasa $IgA_1$, anticorpul cel mai frecvent întîlnit la om. Ele au fost evidențiate la *Streptococcus pneumoniae, S. sanguis, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, N. meningitidis* etc.

IgA proteazele acționează clivînd moleculele de $IgA_1$, respectiv lanțul H la nivelul unei legături peptidice prolil-treonil sau prolil-seril, determinînd eliberarea fragmentelor Fc și Fab intacte (Kilian și colab., 1983).

Anticorpii $IgA_2$ sînt rezistenți la clivare, deoarece ei au în structura catenei H, în apropierea regiunii „balama", o deleție caracteristică, de 16 aminoacizi, care include legăturile peptidice sensibile la protează.

Prezența IgA proteazelor reprezintă un factor important pentru virulență, deoarece permite bacteriilor patogene să supraviețuiască pe suprafața membranelor prin neutralizarea unui factor important al răspunsului imun al gazdei.

În general, sinteza IgA proteazelor este asociată, la bacteriile respective (cu excepția *N. gonorrhoeae*), cu prezența capsulei (efect antiopsonizant), fapt care le conferă avantaje deosebite în colonizarea mucoaselor.

Pentru a inhiba activitatea IgA proteazelor, organismele-gazdă produc în cursul răspunsului lor imun anticorpi (IgA și IgG) anti-protează, rezistenți la acțiunea enzimelor. Ei inhibă acțiunea IgA proteazelor, probabil, printr-o combinare specifică reacțiilor de tipul antigen—anticorp.

### Rolul cationului Fe în virulență

Multiplicarea eficientă a bacteriilor patogene în țesuturile organismelor-gazdă este condiționată de prezența obligatorie a cationului Fe, într-o formă accesibilă metabolismului lor. Această exigență este demonstrată de numeroase fapte de observație. Astfel, *Corynebacterium renale* este neinfectant în medii lipsite de Fe, dar induce pielonefrite la șobolani cînd se dezvoltă în prezența $Fe^{3+}$ exogen. Efectul este realizat dacă se injectează *in vivo* Fe 10 $mg/kg^{-1}$.

Cationul Fe este necesar pentru o varietate de reacții enzimatice esențiale pentru creștere, el acționînd ca un cofactor *per se* sau ca parte a unui grup prostetic, în special de tip *hem*, și reprezintă un component-cheie al catenei de transport al electronilor în membrana celulară.

Deși în cele mai multe medii naturale, ca și în organismul mamiferelor Fe este prezent în cantități suficient de mari pentru a asigura practic creșterea nelimitată a microorganismelor, el se găsește în forme nutrițional inaccesibile.

Astfel, concentrația normală a Fe în plasma mamiferelor ($\geqslant 10$ μM) este teoretic satisfăcătoare pentru creșterea și multiplicarea bacteriilor, dar numeroși factori fac acest Fe inaccesibil microorganismelor, realizînd astfel o lipsă constantă de Fe disponibil. Or, după cum s-a demonstrat, în timp ce un deficit minor are efecte bacteriostatice un deficit important are efecte letale, printr-o acțiune exercitată, în principal, la nivelul sintezei proteinelor.

**Mecanismul insolubilizării Fe în organismele animale.** Fe anorganic este extrem de insolubil în aerobioză și în limite fiziologice de pH (la pH neutru, solubilitatea hidroxizilor ferici este de $10^{-6}$ g/l).

În mediile naturale, el este aproape integral legat de agenți chelatori (compuși chimici în care un ion metalic multivalent este captat, sechestrat și legat puternic în structura ciclică a agentului chelator sau complexonului).

În organismul mamiferelor este legat în complexe organice cu proteinele.

Datorită acestor particularități, bacteriile invadatoare trebuie să competiționeze pentru $Fe^{3+}$ cu unii constituenți intracelulari ca feritina, hemosiderina, gruparea hem și cu unele glicoproteine extracelulare, ca lactoferina (prezentă în lapte, lacrimi, salivă și, în general, la suprafața mucoaselor), precum și cu transferina din sînge și limfă. Toate aceste substanțe au o mare afinitate de asociere cu Fe și normal sînt numai parțial saturate (Owen, 1988). Astfel, transferina, proteina majoră de transport a Fe în plasma sanguină, are ocupată numai 30% din capacitatea sa de legare.

În ansamblu, acești factori reduc concentrația $Fe^{3+}$ liber în organism la valori foarte scăzute ($6 \times 10^{-9}$ μM), care fac serul sanguin uman bacteriostatic. Concentrația minimă ce asigură creșterea și multiplicarea bacteriilor variază între 50 nM și 4 μM) (Brubaker, 1985).

Fe disponibil este și mai redus în cursul infecțiilor hipoferhemice ale gazdei, care implică încorporarea preferențială a Fe derivat de la hem în rezervele de feritină ale SRE (Bagg și Neilands, 1987).

**Mecanismele de obținere a Fe necesar pentru creșterea bacteriilor.** Cultivată în condiții de restricție a aprovizionării cu Fe, *Escherichia coli* sintetizează mai multe sisteme biochimice care asigură translocația Fe feric ($Fe^{3+}$) în celulă,

urmată de conversia la o formă utilizabilă în metabolismul celular ca ion feros ($Fe^{2+}$).

Au fost descrise două mecanisme majore:

1) **Sinteza și secreția unor agenți chelatori de tipul sideroforilor.** *Sideroforii* sînt substanțe cu greutate moleculară mică, avînd în structură grupări caracteristice de tipul catechol, fenolat, hidroxamat sau ferioxamină. Ei au o structură moleculară caracteristică, demonstrată în cazul enterochelinei și definită ca o „cușcă moleculară" („molecular cage") (fig. 172).

Fe feric este legat în centrul ei, ca parte a unui complex octaedric cu 6 coordonate. Acestea sînt menținute de trei seturi de liganzi „bidentați", în care atomii de oxigen interacționează cu orbitalele moleculare ale metalului. După Lewin (1984), datorită dimensiunilor reduse și sarcinii cu potențial negativ înalt, oxigenul se comportă ca o „bază tare", în timp ce Fe feric, pentru aceleași rațiuni (exceptînd sarcina sa care este pozitivă), se comportă ca un „acid tare". Interacțiunile dintre bazele tari și acizii tari sînt foarte puternice, fapt care explică marea afinitate a sideroforilor pentru Fe feric. Ei leagă $Fe^{3+}$ cu o afinitate echivalentă celei a transferinei. Datorită acestei afinități foarte mari, sideroforii pot prelua ionii ferici chiar din minerale ca hematita.

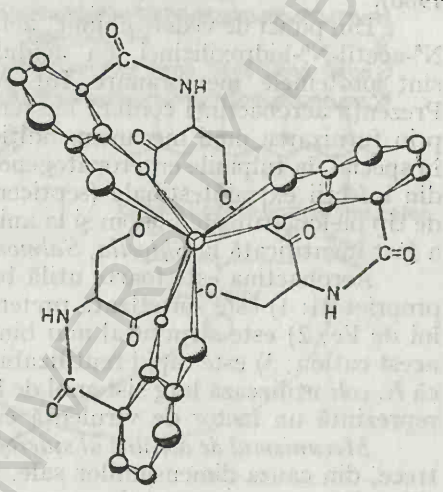



Fig. 172. — Reprezentarea schematică a sideroforului enterobactină, ce capturează fierul în centrul unui complex octaedric. Complexul are o mare afinitate pentru Fe feric, pe care, cu toate acestea, îl schimbă foarte repede (după Lewis, 1984).

Lewin (1984) scoate în evidență teleonomia structurii moleculare a sideroforilor, evidențiată de adaptarea perfectă a „nișei" în care sînt introduși ionii de $Fe^{3+}$ la dimensiunile lor și de afinitatea redusă pentru ionii competitori etc. care permite deopotrivă legarea dar și cedarea cu ușurință a $Fe^{3+}$.

Biosinteza sideroforilor de către bacterii este indusă de diminuarea $Fe^{3+}$ în limite inferioare concentrației-prag (10 $\mu$M Fe).

Imobilizarea Fe este un proces ce necesită consum de energie, iar translocația în celule implică participarea produsului genei *ton B* și a altor proteine membranare cu rol în translocație.

Acțiunea sideroforilor este suficient de eficientă pentru a asigura creșterea microorganismelor în medii deficitare în Fe.

*Principalii sideofori.* În ultimii ani s-a demonstrat structura completă a mai multor sideofori și rolul lor în transportul Fe cu mare afinitate, nu numai în cazul bacteriilor patogene, cît și în cel al unor bacterii saprofite și comensale, care trăiesc în medii deficitare în Fe. Deși au fost identificate cîteva sute de sideofori, un anumit microorganism sintetizează numai un singur tip sau cel mult două. *Enterochelina* (enterobacterina) este un sideofor fenolat, produs de *Escherichia coli* și de multe alte specii de *Enterobacteriaceae*. Este un triester ciclic al 2,3-dihidroxi-N-benzoil-L-serinei. Complexul $Fe^{3+}$ — enterochelină se

leagă de proteina *FepA* (g.m. 81 kdal) din membrana celulei bacteriene, cu o constantă de asociere a $Fe^{3+} \approx 10^{52}$.

*Aerobactina*, produsă în mod normal de *Aerobacter aerogenes*, este întîlnită și la *E. coli*. Sinteza ei este codificată de un operon format din cinci gene, mărginite de două secvențe de inserție (SI 1) împreună cu care alcătuiește un transpozon*. Este situat fie pe plasmide (Col V), fie pe cromosom (Roberts, 1986).

Din punct de vedere chimic, aerobactina este un produs de condensare al $N^6$-acetil-$N^6$-hidroxilizinei cu acidul citric. Receptorii pentru aerobactină sînt proteinele membranare Iut A (g. m. 74 kdal) (iut = iron *uptake*). Prezența aerobactinei conferă bacteriei *E. coli* un grad sporit de invazivitate, prin furnizarea unui mecanism adițional de obținere a Fe. Ea este întîlnită, în special, la tulpinile enteropatogene foarte enteroinvazive, ca și la cele izolate din infecții extraintestinale (septicemii, meningite neonatale, infecții urinare de tip pielonefrite etc.) la om și la animale. De asemenea, prezența aerobactinei a fost identificată la *Shigella, Salmonella, Yersinia, Klebsiella, Enterobacter* etc.

Aerobactina este foarte utilă bacteriilor patogene datorită următoarelor proprietăți: 1) este sintetizată preferențial sub acțiunea inductoare a deficitului de Fe; 2) este structural mai bine adaptată pentru a prelua și transporta acest cation; 3) este rapid reutilizabilă în transport. În general, se poate spune că *E. coli* utilizează larg sistemul de înglobare a Fe mediat de aerobactină, care reprezintă un factor de virulență esențial pentru tulpinile invadante.

*Mecanismul de acțiune al sideroforilor*. Complexul $Fe^{3+}$ — sideofor nu poate trece, din cauza dimensiunilor sale, prin porii învelișurilor celulare ale bacteriilor. El este recunoscut de un receptor specific, situat la *E. coli* în membrana externă, cu ajutorul căruia este introdus în celula bacteriană într-o formă accesibilă metabolismului.

Receptorii membranari de siderofori sînt proteine cu g.m. 70—80 kdal (74 kdal la *E. coli*). Așa cum s-a demonstrat, ei au și posibilitatea de a lega unii fagi și o serie de proteine letale, care pot „mima" structura ligandului natural, substituindu-se acestuia. Menținerea acestor receptori potențiali nocivi în cursul evoluției demonstrează, după Lewin (1984), importanța esențială a Fe în biologia bacteriilor.

Au fost descrise două mecanisme capabile să asigure transportul Fe în celule:

1. Transferul $Fe^{3+}$ transmembranar, în celula bacteriană asociat cu reducerea lui la forma feroasă ($Fe^{2+}$) și menținerea sideroforului la exterior.

2. Transferul întregului complex $Fe^{3+}$ — sideofor prin membrana celulară, urmat de eliberarea Fe redus, prin degradarea parțială sau totală a sideroforului. Este posibil ca sideroforii să revină intacți la suprafața celulei pentru a relua ciclul.

**Bazele genetice ale transportului Fe la bacterii.** Bindereif și Neilands (1983) au studiat mecanismele genetice ale transportului Fe și reglarea lor în funcție de exigențele nutriției. Pe această bază, studiind organizarea și funcțiile operonului Fe pentru aerobactină au propus un model general prezentat în figura 173.

Acest operon codifică, prin genele $\alpha$, $\beta$ și $\gamma$, sinteza a trei produși cu g.m. de 33,32 și respectiv 53 kdal implicați în formarea sideroforului. Componentul

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 124.

de 53 kdal ar fi în mod particular activ în înglobarea Fe în complex. Gena ω codifică o proteină cu g.m. 74 kdal, corespunzătoare receptorului membranar. În sfîrșit, operonul codifică o proteină represor (63 kdal) cu rol esențial în exprimarea informației sale genetice.

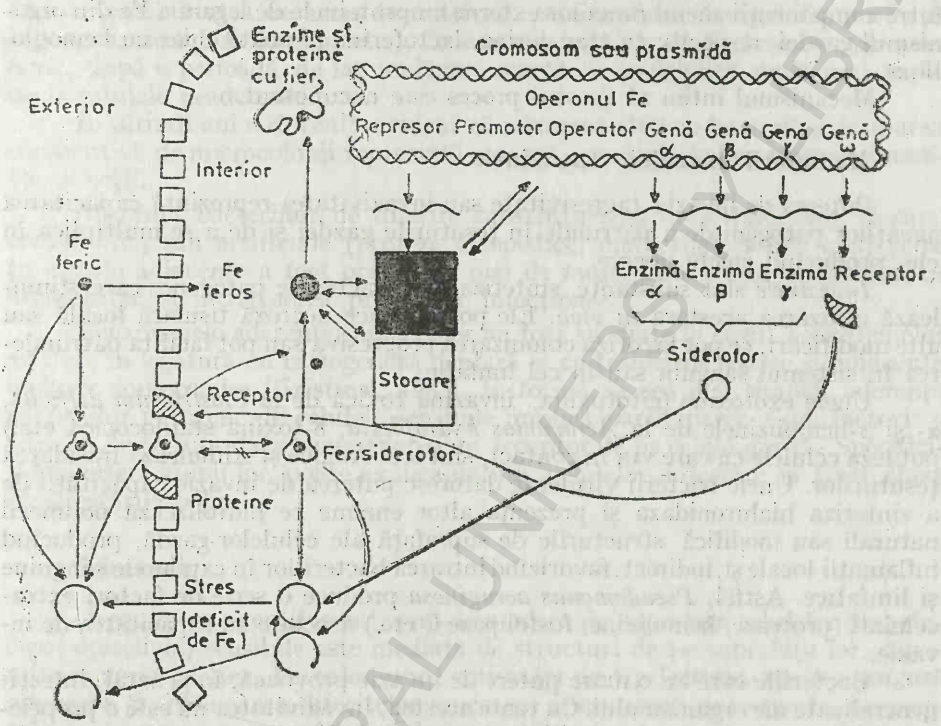



Fig. 173.— Reprezentarea schematică a mecanismului de transport al fierului în celula bacteriană. Deficitul de Fe declanșează sistemul de sinteză al sideroforilor și necesită prezența receptorului membranar. Odată format, complexul Fe — siderofor se leagă de receptor și pătrunde în celulă. Cînd nevoia de Fe este satisfăcută, excesul de Fe se combină cu un represor și întrerupe activitatea sistemului (după Lewin, 1984).

Cînd concentrația intracelulară a Fe este satisfăcătoare, funcționarea operonului este blocată de formarea unui complex Fe — represor. Cînd această concentrație scade la un nivel critic, operonul este activ, declanșînd sinteza concomitentă a sideroforului și a receptorului membranar.

Este probabil că sideroforii au apărut în cursul evoluției pentru a asigura creșterea bacteriilor din microbiota intestinală și nu pentru a permite trecerea lor în sînge și în țesuturi.

Descoperirea sideroforilor deschide calea unor aplicații practice de perspectivă;

1) blocarea specifică a transportului Fe în bacteriile patogene ar putea reprezenta un mecanism de limitare sau chiar de inhibare selectivă a activității lor *in vivo;*

2) sideroforii ar putea fi folosiți pentru îndepărtarea surplusului de Fe din organismele care l-au înglobat în exces, datorită unor perturbări ale metabolismului sau unor transfuzii repetate.

**2) Al doilea mecanism de preluare a Fe este propriu unor bacterii** *(Neisseria meningitidis, N. gonorhoeae, Bordetella pertussis)*, care nu au nevoie absolută de Fe, nu produc siderofori, cel puțin în cantități demonstrabile (Dyer și colab., 1987). Aceste bacterii preiau Fe, în mod direct, prin contact selectiv între componenții membranei lor externe cu proteinele de legare a Fe din organismul gazdei, respectiv cu transferina, lactoferina și poate chiar cu hemoglobina..

Mecanismul intim al acestui proces este necunoscut.

### Mediatorii invaziei. Invazinele

Puterea de invazie (agresivitate sau invazivitate) reprezintă capacitatea agenților patogeni de a pătrunde în țesuturile gazdei și de a se multiplica în ele, producînd efecte nocive.

*Invazinele* sînt substanțe sintetizate de bacteriile patogene, care stimulează difuzarea acestora *in vivo*. Ele pot produce necroză tisulară locală sau alte modificări, ce pot favoriza colonizarea progresivă sau pot facilita pătrunderea în sistemul sanguin sau în cel limfatic.

Unele exotoxine (citotoxina, invazina toxică de la *Clostridium difficile*, α- și β-hemolizinele de la *Aeromonas hydrophyla*, δ-toxina stafilococică etc.) pot leza celulele cu care vin în contact, sînt leucotoxice și stimulează invadarea țesuturilor. Unele bacterii virulente datoresc puterea de invazie capacității de a sintetiza hialuronidaza și prezența altor enzime ce hidrolizează polimerii naturali sau modifică structurile de suprafață ale celulelor-gazdă, producînd inflamații locale și, indirect, favorizînd intrarea bacteriilor în capilarele sanguine și limfatice. Astfel, *Pseudomonas aeruginosa* produce o serie de factori extracelulari (proteaze, hemolizine, fosfolipaze C etc.) asociate cu capacitatea de invazie.

Bacteriile care au o mare putere de invazie provoacă, în general, infecții generalizate ale organismului. Cu toate acestea, invazivitatea nu este o proprietate obligatorie pentru bacteriile care produc boli grave sau chiar mortale. Unele specii neinvazive, dar puternic toxigene pot produce moartea prin intoxicație.

## ADERENȚA BACTERIILOR DE CELULELE ORGANISMULUI-GAZDĂ

Legarea bacteriilor patogene de celulele sensibile reprezintă etapa inițială și o precondiție obligatorie a procesului infecțios. Ea împiedică îndepărtarea bacteriilor prin fluxul diferitelor secreții, prin tuse, mobilitatea foarte activă a cililor, peristaltism etc., asigurînd colonizarea anumitor situsuri din organism, multiplicarea, sinteza toxinelor și evoluția unor reacții inflamatorii. Bacteriile aderă, în principal, de epiteliile mucoaselor, dar și de celule epiteliale keratinizate, endotelii, oase, dinți etc. În unele cazuri, acest fenomen se manifestă cu un grad important de selectivitate, în altele este total nespecific.

Aderența implică cu necesitate apropierea strînsă dintre cele două tipuri de celule, care permite interacțiunea situsurilor complementare de pe suprafața lor. Deși cele mai multe bacterii sînt încărcate negativ, ele posedă regiuni de suprafață limitate electropozitive și, de asemenea, molecule cu caracter hidro-

fob (hidrofobine). Prezența grupărilor cu sarcini opuse și a hidrofobinelor asigură, totuși, apropierea și interacțiunea foarte stabilă între două suprafețe foarte electronegative (Doyle și Sonnenfeld, 1989).

Așa cum s-a demonstrat, pe lîngă rolul esențial în declanșarea procesului infecțios, aderența reprezintă un avantaj ecologic major pentru bacteriile patogene (posibilitatea de acces la nutrienți, temperatură, favorabilă, protecție față de anticorpi și lizozim etc.). Ca dovadă, celulele de *Escherichia coli* aderente, după o perioadă de lag mult mai scurtă se multiplică mult mai rapid decît celulele neaderente.

În ultimii ani a devenit evident că aderența cîtorva bacterii și formarea consecutivă de microcolonii reprezintă o etapă esențială în dezvoltarea anumitor infecții.

Aderența bacteriilor de diferite substraturi naturale (mucoase, leziuni osoase etc.) sau artificiale (proteze ortopedice, metacrilat, sonde etc.) și pe țesuturile adiacente a fost observată mai de mult, fără a face o legătură cu declanșarea și întreținerea proceselor infecțioase.

Mecanismele aderenței bacteriilor au fost studiate în cazul ecosistemelor marine, în legătură cu cariogeneza dentară și cu țesuturile osoase și adiacente biologic compromise (Gristina, 1985). În forma sa cea mai simplă, aderența bacteriilor patogene de celulele sensibile implică participarea a doi factori: o adezină de pe suprafața bacteriilor și un receptor de pe celula-gazdă. Specificitatea interacțiunii lor poate explica natura celulelor infectate și final chiar manifestările bolii.

### Adezinele

Capacitatea agenților patogeni de a adera de suprafața celulelor (în principal epiteliale) sensibile este mediată de structuri de pe suprafața lor, denumite generic *adezine*. Pe calea unor activități de tip lectinic, acestea asigură aderența și colonizarea diferitelor mucoase: respiratorii, intestinale, urogenitale și chiar a unor suprafețe solide ca dentina.

Fenomenele de aderență au fost studiate la un număr relativ important de bacterii patogene care includ: *Streptococcus salivarius*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. cricetus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* sp., *Proteus mirabilis*, *Haemophylus* sp., *Mycoplasma pneumoniae*.

Au fost descrise și caracterizate mai multe tipuri de adezine diferite ca arhitectură moleculară, specificitate de legare moleculară, proprietăți serologice și bază genetică. În același timp s-a demonstrat că unele bacterii patogene au mai multe tipuri de adezine. Un caz extrem îl reprezintă *Pseudomonas aeruginosa* ,care utilizează 27 de mecanisme diferite de aderență, ce includ interacțiuni proteină/proteină, fimbrii, adezine specializate pentru acidul sialic, manoză, N-acetil-manozamină, interacțiuni hidrofobe, exopolizaharide, adezine de lipide etc. (Doyle și Sonnenfeld, 1989).

**Principalele tipuri de adezine.** Lista adezinelor este mare și cuprinde, pe lîngă lectinele bacteriene și fimbrii, diferite structuri moleculare (acizii lipoteichoici, fibronectinele, proteinele de suprafață celulară, hidrofobinele, polianionii, polizaharidele extracelulare etc. (tabelul nr. 29).

*Tabelul nr. 29*

**Exemple de adezine și receptori, care mediază legarea unor bacterii patogene de suprafața mucoaselor** (după Abraham și Beachey, 1985)

| Microorganismul | Adezina | Receptorul |
|---|---|---|
| *Escherichia coli* | Fimbrii tip — 1 | D-manoză |
| | Fimbrii P | α-D-Galp-(1-4)-β-D Galp |
| | Fimbrii K 88 | β-D-Gal sau Glc, Gal și Fuc (gangliozid $Gm_1$) |
| | Fimbrii K 99<br>Fimbrii CFA | Gal Nac β(1—4) Gal β(1=4) Glc<br>\| (gangliozid $GM_2$) 2 NeuAc |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Fimbrii | Resturi de acid sialic |
| *Vibrio cholerae* | Fimbrii | Fucoză |
| *Neisseria gonorrhocae* | Fimbrii | Gal β(1—3)Gal Nac β(1—4) Gal |
| *Staphylococcus aureus* | Acidul lipoteichoic | Fibronectine |
| *Streptococcus pyogenes* | Complexul acid lipoteichoic — proteină M(fibrile). | Fibronectine |
| *Streptococcus mutans* | Proteina de legare a glucanului | Glucan |
| *Streptococcus salivarius* | Lectina suprafeței celulare | Galactoză |
| *Streptococcus sanguis* | Acidul lipoteichoic | Resturi de acid sialic |

## Rolul fimbriilor în adeziune

Fimbriile sînt apendice filamentoase tubulare neflagelare, rigide, dispuse, în general, pericelular. Sînt prezente în număr mare (pînă la 1000/celulă). Sînt codificate de gene cromosomale și neimplicate în transferul de ADN viral, cromosomal sau plasmidal*). Au lungimea de ~ 200 nm și un diametru de 6—7 nm.

Una din bacteriile cel mai mult studiate este *Escherichia coli* uropatogenă pentru om la care au fost descrise mai multe tipuri de fimbrii diferite pe baza morfologiei, a situsului specific de legare etc. (tabelul nr. 30). Pe de altă parte, studiul localizării receptorilor pe celulele mamiferelor (în rinichiul uman și în vezica urinară) cu ajutorul marcării diferențiale (cu izotiocianat de fluoresceină și tetrametil-rodamină) a permis explicarea mecanismului infecțiilor urinare ascendente.

**Fimbriile tip —1**, prezente la cele mai multe *Enterobacteriaceae* studiate se leagă de resturile de D-manoză din structura glicoproteinelor de pe suprafața celulelor eucariote (Eisenstein, 1988). Inițial, se consideră că fimbriile, în general, sînt formate dintr-un număr mare de molecule identice de *fimbrilină* (g. m. 17—21 kdal), proteine dispuse după o simetrie helicală.

După date recente, la bacteriile patogene, cea mai importantă este o proteină minoră, de tip lectină, localizată la extremitatea liberă a fimbriilor sau inserată periodic de-a lungul lor, care conține situsul de legare a D-manozei de pe suprafața celulelor eucariote.

Proteina majoră — fimbrilina — are rol structural și de susținere a unei adezine ce poartă specificitatea de legare de receptorii celulari.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 375.

*Tabelul nr. 30*

**Adezinele fimbriilare prezente la tulpinile de *Escherichia coli*, asociate cu infecțiile căilor urinare umane și cu meningita neonatorum**
(după date din Owen, 1988, și Korhonen și colab., 1988)

| Tipul de adezină | Caracteristicile situsului de legare | Tipul de celule de care se leagă: | | Maladia |
|---|---|---|---|---|
| | | Rinichi | Vezica urinară | |
| Fimbriile tip — 1 (~80% din totalul tulpinilor) | Oligomanozide din structura glicoproteinelor | Lumenul tubulilor proximali, pereții vasculari | Stratul muscular, pereții vasculari | Infecții urinare și intestinale |
| Fimbriile P | α-D-Gal *p*-(1-4)β-D Gal*p* din glicosfingolipide | Lumenul tubulilor distali și proximali, și al canalelor colectoare, endoteliu, glomeruli. | Epiteliu, endotelii, stratul muscular | Pielonefrite, infecții urinare |
| Fimbriile S | Secvențele NeuNAcα2-3DG al B1-4D G lcNAc din glicoproteine | Lumenul tubulilor distali și proximali, și al canalelor colectoare endoteliu, glomeruli. | Epitelii, endotelii, țesutul muscular, țesutul conjunctiv | Meningite, infecții ale nou-născuților |
| Fimbriile tip — 1C | Necunoscute | Lumenul tubulilor distali și al canalelor colectoare, endotelii | Endotelii | Pielonefrite |
| Adezina 075X | Hemaglutinant, leagă colagenul tip IV; legarea inhibată de cloramfenicol | Membrane bazale | Țesutul conjunctiv; legare slabă de epitelii | Infecții urinare |

Gal NAc = N-acetil-D-galactozamină; Glc NAc = N-acetil-D-glucozamină.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În timp ce proteina majoră diferă ca structură primară între diferitele specii enterice, adezina minoră este conservată la un număr important de specii ale familiei *Enterobacteriaceae*.

Fimbriile tip —1 permit adeziunea de tractul intestinal și de mucoasa intestinului gros. În general, acțiunea lor asupra epiteliului căilor urinare este contracarată de acțiunea inhibitoare a unei glicoproteine cu manoză (proteina Tamm-Horsfall) produsă în rinichi și eliberată în urină. Ea are rolul de a proteja rinichiul de infecția cu *E. coli*, prin inhibarea legării fimbriilor tip —1 de receptorul lor.

**Fimbriile (pilii)P** sau Pap(*P*yelonephritis *a*ssociated *pili*)*, cunoscute sub diferite denumiri ca fimbrii care leagă globozidele, fimbrii care leagă digalactozidele sau fimbrii Gal-Gal (Gal-Gal „binding fimbriae"), recunosc dizaharidul α-Gal (1→4) β-Gal și se leagă, probabil, cu eficiență diferită de toate suprafețele epiteliale ale căilor urinare.

Localizarea situsurilor de legare identificate sugerează o cale ascendentă de invazie în rinichi și ulterior în sistemul circulator. Prezența lor reprezintă un factor major de virulență bacteriană, deoarece se leagă rapid de receptori și nu sînt influențate de prezența inhibitorilor din urină.

**Fimbriile S** nu sînt asociate cu uropatogenitatea. La *E. coli*, deși celulele recunosc glicoconjugate cu acid sialic, legarea lor este blocată de inhibitorii prezenți în concentrație normală în urină, (în special de proteina Tamm-Horsfall).

**Fimbriile tip —1C** sînt, în general, asociate cu fimbriile P și măresc potențialul invaziv al acestora.

**Adezina 075X** favorizează colonizarea căilor urinare inferioare și reprezintă un factor important de virulență prin legarea de epiteliile lezate ale căilor urinare superioare.

**Rolul fimbriilor în virulența bacteriilor.** Experimental s-a demonstrat că bacteriile fimbriate ($fim^+$) sînt mai virulente decît variantele lor $fim^-$.

De asemenea, s-a evidențiat că blocarea lectinelor fimbriale cu ajutorul glucidelor specifice complementare și împiedicarea, pe această cale, a legării lor de receptori reduce masiv virulența unor tulpini de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*. Cele mai multe bacterii au două sau mai multe tipuri de fimbrii cu specificități de legare diferite. Prin aceasta crește numărul celulelor purtătoare de receptori diferiți cu care se pot asocia bacteriile. De cele mai multe ori, bacteriile patogene nu exprimă simultan întregul repertoriu de adeziune, ci succesiv și corelat cu diferite faze ale infecției. În felul acesta, aderența nu este importantă numai pentru inițierea infecției (în întîlnirea dintre patogen și gazdă), ci în întreg cursul ciclului de infecție.

Un factor agravant este reprezentat de capacitatea fimbriilor de a suferi variații de fază. Aceasta explică heterogenitatea tulpinilor de *E. coli* din căile urinare și capacitatea lor de a adera de diferite suprafețe ale celulelor, la niveluri diferite ale căilor urinare, precum și de a evita acțiunea anticorpilor sau fagocitelor (Korhonen și colab., 1988). Diversitatea genetică apărută pe această cale permite bacteriilor să se adapteze schimbărilor din mediu și să dobîndească posibilități noi de legare a altor receptori de pe suprafața celulelor-gazdă (Finlay și Falkow, 1989).

---

* În unele lucrări, termenul *pili* este utilizat în mod eronat ca sinonim cu cel de fimbrii. Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 375.

După Eisenstein (1981), formarea pililor ar fi reglată de un sistem de comutator „stop-start" care acționează la nivelul transcrierii genetice a genelor *fim*. Datorită acestui mecanism, numai o bacterie din 1000/generație ar poseda fimbrii. Aceasta face ca în orice perioadă de creștere, o cultură bacteriană să conțină atît celule cu fimbrii, cît și celule lipsite de aceste adezine.

Fenomenul are o importanță ecologică deosebită: celulele aderente servesc pentru ancorarea și menținerea bacteriilor pe suprafața mucoaselor, în timp ce cele neaderente (fim⁻) au rol în dispersarea la situsuri îndepărtate.

**Rolul fimbriilor în legarea bacteriilor de celulele vegetale.** Cele mai multe bacterii izolate de pe suprafața plantelor sînt fimbriate, dar legarea lor pare să fie mult mai selectivă în sensul afinității pentru anumite regiuni ale organismelor vegetale. Bacteriile din genul *Klebsiella, Enterobacter*, precum și unele specii de *Pseudomonas* se leagă selectiv de celulele suprafeței perilor radiculari. *Pseudomonas syringae pv. phaseolica*, implicată în producerea cristalelor de gheață la temperaturi $< 2°C$, aderă numai de stomate pe fața inferioară a frunzelor plantelor de fasole, în timp ce *P. syringae* var. *syringae* se leagă nelocalizat.

Natura receptorilor de bacterii este necunoscută. Ei ar fi reprezentați pentru *Enterobacter* de mucilagiile din plante, iar pentru *Pseudomonas* de interacțiunile hidrofobe dintre fimbrii și anumite situsuri hidrofobe de pe plante.

În unele cazuri *(P. syringae)*, adeziunea de frunze este corelată cu patogenitatea și reprezintă un factor de virulență pentru că permite imobilizarea bacteriilor și invazia plantei pe calea stomatelor.

În cazul bacteriilor aderente de perii radiculari, efectul poate fi bilateral benefic, cel puțin în cazul unor plante *(Poa pratense, Trifolium pratense)*: bacteriile fixează $N_2$, induc modificări cantitative în dezvoltarea perilor radiculari și beneficiază, la rîndul lor, de nutrienții exsudați din planta-gazdă, care le favorizează colonizarea rădăcinii (Korhonen și colab., 1986).

**Rolul fibrilelor de celuloză în aderența patogenilor vegetali.** Whatley (1976) a demonstrat că *Agrobacterium tumefaciens* se leagă de celulele vegetale prin interacțiunea lipopolizaharidelor din membrana sa externă cu anumite situsuri de legare specifice de pe suprafața acestora. Fenomenul are o semnificație majoră, deoarece explică incapacitatea *A. tumefaciens* de a infecta monocotiledonatele.

Diferența chimică esențială dintre celulele care leagă și cele ce nu leagă *A. tumefaciens* pare să fie legată de gradul de metilare a acidului poligalacturonic. Semnificația adeziunii și a legării este deosebit de importantă deoarece bacteria nu intră în celula vegetală, ci, probabil, transferă plasmida Ti prin peretele bacterian și cel al celulei vegetale, printr-un mecanism asemănător conjugării bacteriene (Nester și Kosuge, 1981).

Experimental, lucrînd cu culturi de celule de morcov, Matthyse (1983) a demonstrat că adeziunea *A. tumefaciens* de celulele vegetale este urmată de, sinteză de fibrile de celuloză. Sinteza celulozei nu este asociată cu virulența care este o proprietate individuală, independentă, dar are un rol esențial în ancorarea bacteriilor de celulele-gazdă, în formarea de grupări mari, vizibile cu ochiul liber, de celule bacteriene, celule vegetale și fibrile, favorizînd tumorigeneza. Mutantele incapabile să sintetizeze celuloză se fixează individual, fapt care influențează cinetica de legare de celulele vegetale.

**Alte efecte ale adezinelor.** Unele adezine pot avea efecte dăunătoare pentru bacteriile patogene. Ele pot stimula legarea și imobilizarea bacteriilor de

suprafața fagocitelor profesioniste, urmate de înglobarea și distrugerea agenților patogeni.

De asemenea, deosebit de gravă este legarea adezinelor de plachetele sanguine și de fibrină, deoarece favorizează depunerea lor pe valvulele cardiace și apariția leziunilor de endocardită (Brubaker, 1985).

Adezinele nu sînt limitate la organismele patogene, ci sînt larg răspîndite la o mare varietate de saprofite. Ca probă, unele microorganisme saprofite din sol ca *Acinetobacter calcoaceticus* se leagă relativ ușor și de celule epiteliale *in vitro*.

### Receptorii de adezine

Rolul receptorilor celulari a fost demonstrat, fără echivoc, de Sellwood și colab. (1975). Porcii foarte rezistenți la infecția cu tulpini de *Echerichia coli K 88*, producătoare de diarei severe, nu au receptori pentru această bacterie, spre deosebire de animalele foarte sensibile care poartă numeroși receptori de adezine. Încrucișarea celor două categorii de animale a demonstrat că sensibilitatea față de infecția cu *E. coli K 88* este codificată de gene dominant autosomale.

În mod asemănător, sensibilitatea omului la pielonefrita cu *E. coli* este corelată cu numărul receptorilor de pe membrana uroepiteliului, foarte variabil de la o persoană la alta.

Sanford și colab. (1980) au observat că pe celulele infectate cu anumite virusuri pot apărea noi receptori de suprafață, absenți pe celulele normale. Fenomenul ar explica apariția infecțiilor secundare bacteriene postvirale (ca, de exemplu, pneumonia bacteriană post-gripală. În felul acesta, o gazdă normal rezistentă devine sensibilă, putînd lega diferite bacterii patogene în cursul și în urma anumitor infecții virale.

Reacția adezine/receptori este bazată pe complementaritate. Ea este, uneori, riguros specifică, în timp ce în alte cazuri este total nespecifică, o anumită bacterie putînd infecta celule eucariote cu proveniențe foarte diferite, care au modalități comune de legare și internalizare. Astfel, după Finlay și Briska (1990), *Salmonella* sp., *Yersinia* sp. etc. pot infecta la fel de eficient celulele intestinale umane și liniile celulare embrionare de *Drosophila*. În schimb, *Streptococcus pyogenes* se localizează frecvent în faringe și rar în urină, iar *E. coli* colonizează frecvent epiteliul intestinal și al căilor urinare și numai rar pe cel respirator. Prin acest mecanism, distribuția receptorilor celulari și diferențele de specificitate explică tropismul diferit al microorganismelor patogene, care se pot lega exclusiv sau preferențial de anumite celule și niciodată de altele.

### Integrinele

Integrinele (Hynes, 1987; citoadezinele, Plow, 1986; Springer, 1990) formează o superfamilie de receptori înrudiți, avînd o varietate de funcții necesare pentru atașarea celulei eucariote de matricele extracelulare, fagocite și aderență intercelulară în general. Ele leagă mai multe tipuri de proteine prezente în sînge și în matricea extracelulară, incluzînd fibronectinele, fibrinogenul, vibronectinele, laminina, colagenul tip I, osteopontina, precum și adezinele microorganismelor patogene.

După Ruoshlahti și Pierschbacher (1987), structura generală a integrinelor este aceea a unui heterodimer alcătuit din două subunități denumite α și β.

Subunitatea α, care are 1100 de aminoacizi, tradusă de la o singură moleculă de ARNm, poate fi ulterior clivată în două fragmente: unul mai mic (g.m. 20 kdal) și altul mai mare, greu (g.m. 120—140 kdal), legate printr-o legătură disulfidică (fig. 174).

Subunitatea β, avînd 750 de aminoacizi, are structura unui polipeptid unic (g.m. 90—140 kdal).

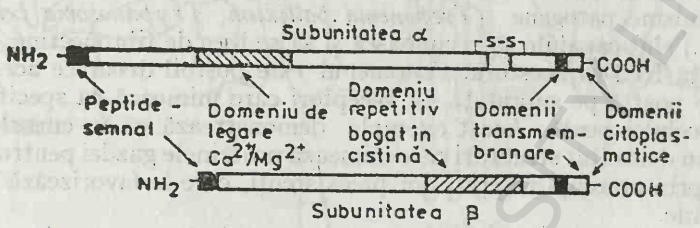



Fig. 174. — Structura moleculară a integrinelor, cu evidențierea semnificației funcționale a diferitelor segmente ale subunității α și β (după Ruoshlahti și Pierschbacher, 1987).

În subunitatea α, secvența aminoacizilor este identică în proporție de 25—65%, iar în subunitatea β, de 37—45%. Asemănările structurale și funcționale sînt atît de mari, încît, după Springer (1990), integrinele pot fi considerate mai degrabă ca o familie de proteine decît ca o superfamilie.

Pe baza secvenței aminoacizilor și a raporturilor cu membrana celulei eucariote a fost propus un model general de structură a receptorului de adezine (fig. 175).

El include, pentru fiecare din cele două subunități, un domeniu extracelular, situat la suprafața membranei, un domeniu transmembranar și un al treilea, intracitoplasmatic, corespunzător extremităților —COOH terminale. Cele două domenii extracelulare participă la interacțiunea cu ligandul, în prezența $Ca^{2+}$ și a $Mg^{2+}$.

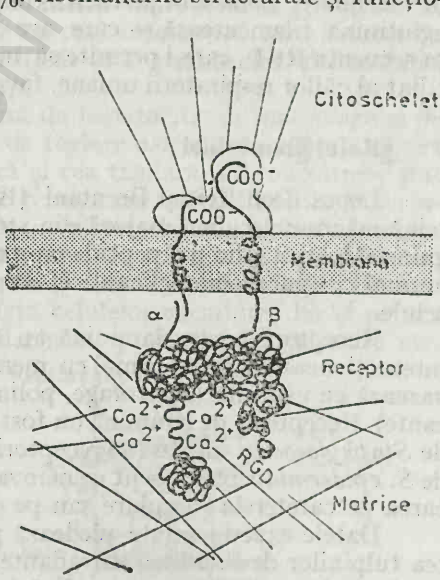



Fig. 175. — Model de structură al unui receptor de adeziune membranar (după Ruoshlahti și Pierschbacher, 1981).

**Mecanismul interacțiunii adezine/integrine.** Modul de legare a diferitelor proteine de integrina-receptor a fost înțeles din momentul în care s-a demonstrat că toate proteinele cu care interacționează au în structura lor una sau mai multe secvențe *Arg—Gly—Asp* (RGD)*, conservate de-a lungul evoluției și care acționează ca secvențe-semnal de recunoaștere. Deși

* RGD — acronim corespunzător nomenclaturii adoptate convențional, prin care fiecare aminoacid este desemnat printr-o singură literă : arginina (R), glicocolul (G), acidul aspartic (D).

secvența de legare RGD este aceeași la diferitele proteine de adeziune; celulele eucariote, respectiv integrinele lor, le pot recunoaște individual specificitatea, deoarece în fiecare caz particular orientarea spațială a resturilor de *Arg — Gly — Asp* este unică și caracteristică. În felul acesta, fiecare integrină recunoaște un anumit ligand care conține o secvență RGD sau cel mult un număr limitat de liganzi.

Ouaissi și colab. (1986) au demonstrat că sistemul de adeziune bazat pe secvența RGD are un rol important în relația parazit — gazdă. Astfel, unele microorganisme patogene *(Treponema pallidum, Trypanosoma cruzi, Leishmania* etc.) sînt capabile să recunoască și să se lege de fibronectine, în funcție de secvența RGD a acestora. Fenomenul este posibil deoarece aceste microorganisme poartă pe suprafața lor receptori care mimează ca specificitate integrinele celulei-gazdă. Acest exemplu demonstrează că, în cursul evoluției, paraziții au dezvoltat structuri care mimează proteinele gazdei pentru a dobîndi avantaje prin prezența receptorilor preexistenți, care le favorizează pătrunderea în celule.

Din categoria integrinelor fac parte și proteinele receptor de complement (PrMac—1 (CR 3) ș.a.), care participă la înglobarea în fagocite a mai multor patogeni *(Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Leishmania donovani* etc.).

Capacitatea de a utiliza integrinele nu este limitată la bacteriile parazite intracelulare. *Bordetella pertussis* conține o proteină mare de suprafață — hemaglutinina filamentoasă — care are funcție de adezină. Ea are în structura sa secvența RGD, care-i permite să interacționeze cu o integrină de pe epiteliul ciliat al căilor respiratorii umane, favorizînd colonizarea bacteriană a acestuia.

### Rolul laminininei

Lopes, Don Reis și Brentani (1985) au studiat rolul laminininei, glicoproteină macromoleculară majoră din structura membranei bazale a vaselor sanguine. Alcătuită din polipeptide cu g.m. 20—40 kdal, laminina interacționează normal cu glucozaminoglicanii și stimulează adeziunea diferitelor tipuri de celule.

Receptorii pentru laminină au fost evidențiați pe suprafața celulelor ce interacționează în mod normal cu membrana bazală, ca și pe celulele care extravazează cu ușurință (macrofage, polimorfonucleare, celule neoplazice metastazante). Receptorii de laminină au fost identificați și pe celulele foarte invadante de *Staphylococcus aureus* (50 receptori/bacterie). Ei sînt absenți de pe celulele de *S. epidermidis* recunoscut ca neinvadant, deși poate fi patogen prin multiplicarea pe cateterele vasculare sau pe dispozitive proteice.

Datele experimentale pledează pentru o corelație strînsă între capacitatea tulpinilor de *S. aureus* invadante, purtătoare de receptori de laminină, și virulența lor extremă, care implică trecerea în sînge, extravazarea și producerea de abcese metastatice la distanță de localizarea inițială.

### Fibronectinele

Numite și *proteine de legare celulară* („Cell binding proteins") sau *factorul de adeziune celulară* („Cell adhesion factor"), fibronectinele reprezintă o clasă de glicoproteine macromoleculare (g.m. 220 kdal) multifuncționale. Sînt prezente în formă solubilă în sînge (~200 μg/ml) și în formă insolubilă în țesuturi

(matricea extracelulară). Pot fi prezente ca dimeri reuniți prin două punți disulfurice la extremitatea —COOH terminală sau ca polimeri. Pe baza secvenței primare a aminoacizilor o subunitate de fibronectină prezintă trei tipuri de omologie: I, II, III (fig. 176).

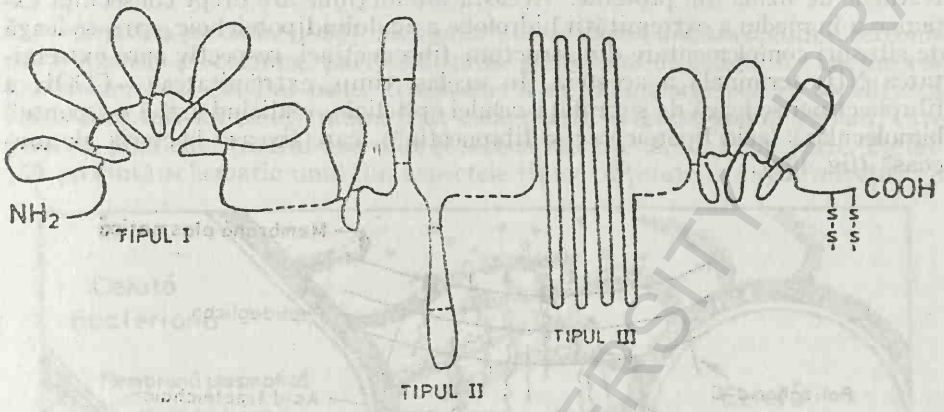



Fig. 176. — Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de omologie (I, II, III) în interiorul secvenței primare a unei subunități de fibronectină (după Ouaissi și Capron, 1985).

Molecula de fibronectină constă din domenii înalt structurate ce conțin situsuri de legare pentru macromoleculele cu care interacționează. Situsul de legare cu celulele de mamifere a fost identificat de Pierschbacher și Ruoslahti (1981, 1984) și are structura *Arg, Gly, Asp.*

Fibronectina plasmatică este produsă de hepatocite, de macrofage și de celulele endoteliale. Un mecanism subtil de reglare asigură un anumit raport între cantitatea de fibronectină plasmatică și cea tisulară. Fibronectinele sînt sintetizate, în plus, de o mare varietate de celule care includ fibroblaștii, celulele Schwann, celulele epiteliale intestinale, condrocitele etc., inclusiv *in vitro.*

Au funcția esențială de a asigura aderarea de celulele de mamifere și o mare afinitate pentru diferite forme naturale și denaturate de colagen, fibrinogen, fibrină, proteoglicani, pentru suprafața celulelor eucariote, dar și pentru cele bacteriene, glicoproteinele virale, adezinele protozoarelor parazite etc.

**Rolul fibronectinelor în aderența bacteriilor patogene.** Dintre numeroasele exemple studiate, cel mai cunoscut și, totodată, cel mai complex este cel al bacteriei *Streptococcus pyogenes* prezentă frecvent în gît și pe mucoasa căilor respiratorii superioare. Proiectată în aer prin tuse, salivă etc., poate afecta un organism nou numai dacă aderă de suprafața mucoaselor acestuia și le colonizează prin multiplicare.

Cunoașterea exactă a structurilor parietale ale bacteriei (fig. 177) a permis înțelegerea

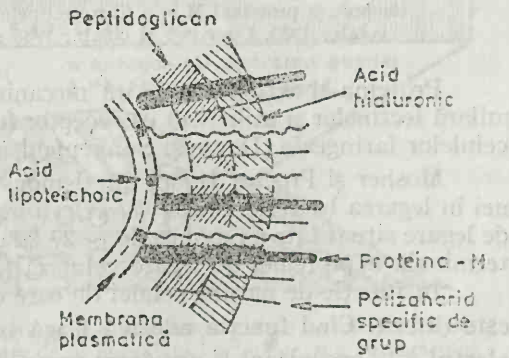



Fig. 177. — Structurile de suprafață implicate în adeziune la *Streptococcus pyogenes* (după Doyle și Sonnenfeld, 1989).

mecanismului complex al fenomenului de aderență de mucoase pe calea unor punți care implică participarea fibronectinelor, a acizilor lipoteichoici și a proteinei M. După cum s-a demonstrat, acizii lipoteichoici formează complexe cu proteina M, datorită interacțiunii dintre poli (glicerofosfați) și resturile de lizină din proteine. Această interacțiune are drept consecință expunerea în mediu a extremității hidrofobe a acidului lipoteichoic, care se leagă de situsuri complementare din structura fibronectinei, respectiv spre extremitatea $NH_2$ terminală a acesteia. În același timp, extremitatea —COOH a fibronectinei se leagă de suprafața celulei epiteliale, realizînd astfel o „punte" bimoleculară (acid lipoteichoic și fibronectină), care fixează bacteria de mucoasă (fig. 178).

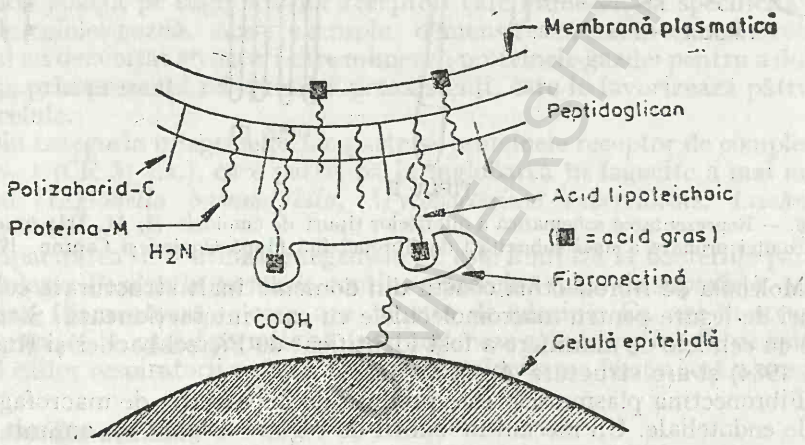



Fig. 178. — Adeziunea bacteriei *Streptococcus pyogenes* de celulele-gazdă este dependentă de o punte de fibronectine (FN). În cursul creșterii, bacteria poate secreta acid lipoteichoic, care se leagă de proteina M, pe calea interacțiunilor proteină — glicerolfosfat, permițînd unei extremități hidrofobe să interacționeze cu situsuri complementare de pe molecula de FN. Aminoacizii carboxiterminali ai FN se leagă puternic de celulele epiteliale. Final, bacteria este legată specific de celulele epiteliale printr-o punte de FN. Modelul implică participarea matricei peretelui celular, a acidului lipoteichoic, a proteinei M și a fibronectinelor (pe baza datelor lui Beachey și colab., 1983, Courtney și colab., 1986 și Pancholi și Fischetti, 1988).

Proteina M acționează ca un mecanism adițional: ea are o activitate similară lectinelor și utilizează ca receptor fucoza sau galactoza de pe suprafața celulelor faringeale (Doyle și Sonnenfeld, 1989).

Mosher și Proctor (1986) au demonstrat, de asemenea, rolul fibronectinei în legarea bacteriei *Staphylococcus aureus*, care ar interacționa cu un situs de legare situat într-o regiune de ~ 27 kdal, apropiată de extremitatea aminoterminală a proteinei de legare celulară (FN).

În funcție de natura celulei de care este legată efectul asupra bacteriei este diferit. Cînd funcția adezivă leagă bacteria de granulocitele neutrofile, efectul este opsonizant și are drept urmare fagocitarea bacteriei și distrugerea ei. Cînd *S. aureus* este legat de fibronectina tisulară, ea furnizează o modalitate de legare care contribuie eficient la virulența bacteriei.

Fibronectinele au un rol important și în legarea glicoproteinelor, asigurînd prin aceasta, recunoașterea virus/celula-gazdă și faza inițială de fixare, premergătoare infecției.

### Bazele moleculare ale colonizării bacteriilor pe un substrat tisular

Gristina și colab. (1985) au studiat, cu ajutorul microscopului electronic cu transmisie și scanning, particularitățile procesului de colonizare bacteriană în osteomielită. Studiul poate fi considerat ca definitoriu pentru localizarea bacteriilor într-un țesut traumatizat compromis, infectat polimicrobian, care persistă pînă cînd țesutul necrozat și sechestrele osoase sînt eliminate. Figura 179 prezintă schematic unul din aspectele tipice obținute în cazul infecției cu

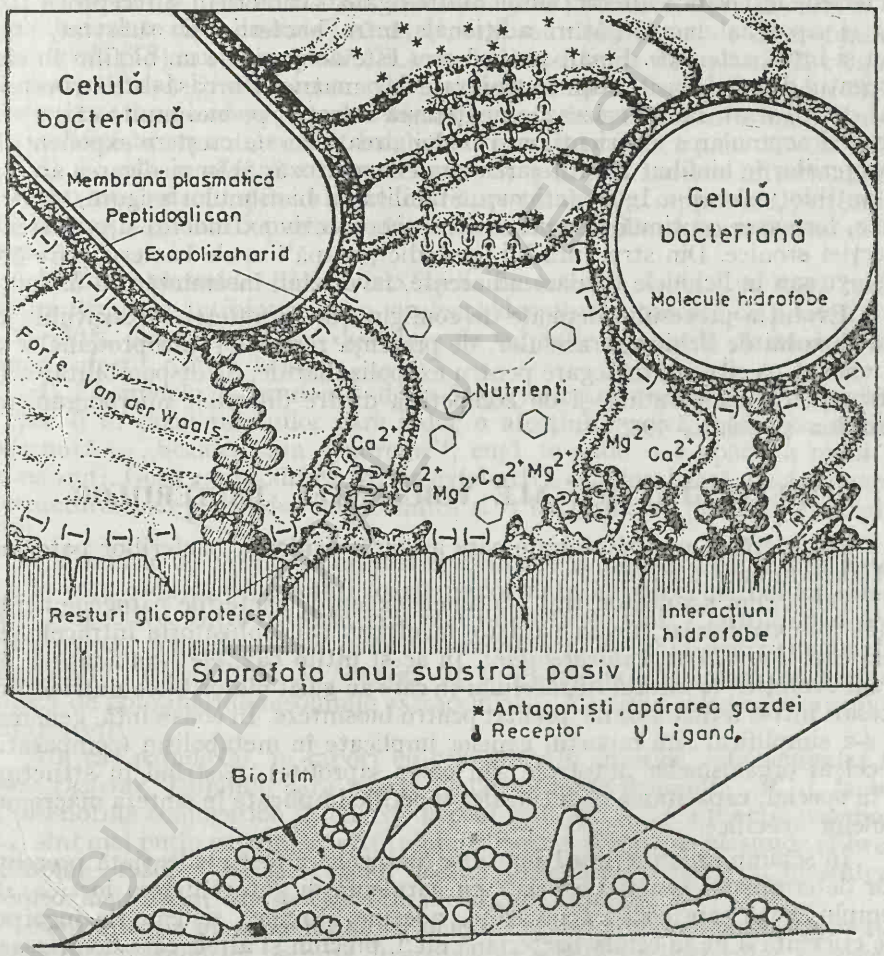



Fig. 179. — Mecanismul aderenței bacteriene. La anumite distanțe specifice, forțele de repulsie dintre sarcinile asemănătoare de pe suprafața bacteriilor și a substratului sînt depășite de forțele de atracție van der Waals, permițînd apariția interacțiunilor hidrofobe între molecule. În condiții corespunzătoare se produce o dezvoltare extensivă a exopolizaharidelor, permițînd interacțiunea ligand — receptor și legarea persistentă a bacteriilor de substrat (după Gristina, 1985).

două tipuri morfologice de bacterii Gram-pozitive (un bacil și un coc), înconjurate de o matrice fibroasă extensivă între ele și cu substratul reprezentat de țesuturile gazdei.

După Gristina și colab. (1985) atît suprafața bacteriană, cît și cea a substratului învecinat sînt polianionice. Inițial, sarcinile electrice asemănătoare resping celulele bacteriene, dar în cadrul anumitor limite, fenomenele de respingere sînt contracarate și depășite de forțele de atracție van der Waals-London, create de fluctuația dipolilor din moleculele suprafețelor bacteriene și tisulare. Juxtapoziția lor la o distanță critică permite realizarea unor interacțiuni hidrofobe între moleculele celor două tipuri de suprafețe, consolidînd legarea bacteriilor de substratul tisular. Sinteza și secreția de exopolizaharide bacteriene intensifică interacțiunile dintre liganzii bacterieni și receptorii tisulari și apariția unor legături adiționale între bacterii și substrat, precum și interbacteriene. Final, țesutul osos este acoperit de un biofilm în care agregatul de celule bacteriene înconjurate de o matrice fibroasă este strîns aderent de substrat. Ea favorizează menținerea infecției pe mai multe căi: 1) favorizînd acumularea nutrienților și prelungirea fazei de creștere exponențială a bacteriilor în biofilm; 2) protejarea lor de fagocitoză; 3) împiedicarea accesului antibioticelor și a Ig — anticorp. Stabilitatea biofilmului asigură, pe de o parte, formarea continuă de microcolonii și respectiv extinderea și persistența infecției cronice. Din structura lui, periodic „scapă" unele bacterii, care trec în sînge sau în lichidele tisulare adiacente, favorizînd însămînțări la distanță.

Evoluția procesului depinde de configurația suprafeței substratului, de rata fluxului de lichid extracelular, de prezența resturilor glicoproteinelor ce acționează ca situsuri de legare pentru exopolizaharide, de disponibilitatea de nutrienți, de temperatură și de competiția dintre diferitele microorganisme (Gristina și colab., 1985).

## BAZELE GENETICE ALE VIRULENȚEI BACTERIILOR

Proprietățile multifactoriale care asigură virulența bacteriilor patogene sînt determinate genetic.

După cum s-a demonstrat, cu unele excepții, bacteriile patogene acționează fie extracelular, fie ca parazite facultativ sau obligatoriu intracelulare (vezi cap. *Parazitismul intracelular*). În acest ultim caz, ele s-au adaptat, în cursul evoluției, la mediul intracelular în care au găsit majoritatea nutrienților necesari într-o formă ușor de preluat pentru biosinteze. În consecință, genomul lor s-a simplificat sub raportul genelor implicate în metabolism (comparativ cu cel al organismelor autotrofe sau chiar saprofite), păstrînd în structura sa, în special, capacitatea de a codifica funcțiile implicate în sinteza macromoleculelor specifice.

În schimb, în structura bacteriilor patogene a fost evidențiată prezența unor determinanți genetici asociați cu virulența și patogenitatea lor (ca, de exemplu, gene care codifică invazine, adezine, toxine, sisteme de încorporare eficientă a Fe în celula bacteriană etc.), precum și altele care favorizează supraviețuirea bacteriilor în anumite condiții adverse (reprezentate de reacțiile de apărare față de răspunsul imunitar al gazdei) și respectiv capacitatea de a competiționa, în anumite medii (intestin, căi respiratorii etc.), cu microorganisme din alte specii. Cei mai mulți determinanți din această categorie sînt situați în structura cromosomului bacterian.

În unele cazuri, determinanții genetici importanți pentru virulență pot fi situați în structura plasmidelor sau chiar a unor fagi temperați (de exemplu, fagul β de la *Corynebacterium diphteriae*, care conține gena pentru toxina difterică).

**Plasmidele*** sînt elemente genetice extracromosomale, care, spre deosebire de cromosomi, conțin informație genetică accesorie, neesențială pentru dezvoltarea bacteriilor-gazdă în mediul lor natural. Ele *conțin gene ce codifică* activități adiționale, care permit gazdei o mai bună supraviețuire în medii adverse sau posibilitatea de a competiționa cu alte specii.

*Plasmidele de virulență* au fost evidențiate în cazul a numeroase bacterii patogene:

1) Bacteria *Escherichia coli enteropatogenă* produce, spre deosebire de tulpinile izolate de la indivizii sănătoși, una sau două tipuri de enterotoxine: *termostabilă* (TS) sau *termolabilă* (TL), ambele codificate de o plasmidă cu g.m. 55—61 × $10^6$ dal. De asemenea, cele mai multe tulpini sintetizează un *antigen de colonizare* sau de *aderență*, care asigură legarea de epiteliul intestinal. Genele care codifică acest antigen sînt localizate pe o plasmidă cu g.m. 22—29 kdal.

2) *E. coli invadantă* are capacitatea de a depăși bariera intestinală, de a produce infecții generalizate extraintestinale (cu septicemie, peritonite etc.) la om și animale domestice, datorită unei plasmide ce le conferă această proprietate.

3) Unele plasmide „R" de la *Shigella dysenteriae* conferă, pe lîngă rezistența multiplă la antibiotice, și o virulență deosebită, marcată de o letalitate de 20—30% din cazuri, spre deosebire de tulpinile lipsite de plasmide, care produc infecții relativ benigne.

4) Plasmidele de virulență de la *Staphylococcus aureus* au fost descrise în special în cazul tulpinilor care induc o afecțiune gravă (necroliza toxică epidermică = „Scalded skin syndrome"; engl. to scald = a opări) a pielii la nou-născuți. Gena care codifică toxina exfoliativă este localizată, de asemenea, în structura unei plasmide, care codifică și o bacteriocină (Warren și colab., 1979).

Plasmidele de virulență au fost evidențiate la numeroase bacterii patogene la care codifică proprietăți foarte importante în patogenia bolilor infecțioase respective. Între acestea, cele mai importante sînt: *Clostridium tetani* (neurotoxină), *Shigella sonnei* (enteroinvazivitate), *Yersinia pestis* (invazie și toxigenitate), *Clostridium perfringens* tip C (β-toxină), *Streptococcus mutans* (sinteză de polizaharide insolubile extracelulare), *Yersinia enterocolitica* (invazivitate) etc.

Un caz paradoxal, în raport cu cele descrise anterior, este semnalat la *Vibrio cholerae*. Tulpinile care poartă două plasmide denumite „P" („factor sex promoting conjugation"), cu rol de conjugon, și „V" (cu funcție necunoscută) sînt mai puțin patogene decît tulpinile izogene lipsite de plasmide (Elwell și Shipley, 1980). Produșii genelor acestor plasmide interferă cu biosinteza enterotoxinei sau cu transportul prin membrana celulară.

**Semnificația plasmidelor de virulență.** Prezența determinanților genetici în structura plasmidelor permite diversificarea genetică a bacteriilor patogene cu păstrarea nealterată a integrității cromosomilor. Deoarece determinanții de virulență sînt incluși în transpozoni (Tn)** există posibilitatea ca, uneori, un

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 74.
** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 120

întreg bloc de gene să poată fi transferat prin intermediul unei plasmide de la o bacterie la alta. În felul acesta, *E. coli* comensal/saprofit poate deveni enterotoxic și aderent sau invaziv, producînd boli foarte severe. Odată transferați, determinanții de virulență au tendința de a fi păstrați în timp, deoarece conferă bacteriei-gazdă avantaje selective de supraviețuire.

### Mecanisme de reglare a genelor de virulență ale bacteriilor patogene corelate cu temperatura de creștere

Bacteriile patogene pentru om și animalele cu sînge cald sînt obligate, prin înseși mecanismele lor de transmitere, demonstrate de epidemiologie, să treacă în mod continuu, pentru a supraviețui, dintr-un mediu constant, controlat termic (~ 37°C în organismul uman), într-un mediu extern, în care temperatura este fluctuantă și oricum îndepărtată de 37°C.

După Miller, Mekalanos și Falkow (1989), precum și după Maurelli (1989), exprimarea în mediul extern a genelor relativ numeroase, care permit bacteriilor patogene să competiționeze cu mediul ostil reprezentat de organismul-gazdă, este inutilă și ar reprezenta chiar un dezavantaj selectiv. De aceea, bacteriile patogene au dezvoltat un sistem care asigură funcționarea lor numai cînd se găsesc în organismul-gazdă, fapt care determină un efect benefic și prin economia de energie celulară.

Studiile de genetică moleculară efectuate pe *Shigella* sp., *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis* și *Staphylococcus aureus* au demonstrat existența unor particularități comune:

1) prezența genelor de virulență și organizarea lor în sisteme de reglare de tipul reglonilor*;

2) existența unui sistem de răspuns concertat față de anumiți stimuli specifici care semnalează transferul agenților patogeni din mediul extern în organismul-gazdă și capacitatea acestuia de a determina activarea genelor de virulență;

3) stimulul declanșator ideal al activării în cazul bacteriilor patogene pentru om și, probabil, pentru animalele cu sînge cald este temperatura.

Cele mai multe date se referă la *Shigella* sp. la care genele esențiale pentru virulență sînt răspîndite atît pe cromosom, cît și pe o plasmidă cu g.m. 200 kdal. Ele determină capacitatea de pătrundere a bacteriei în celulele epiteliale ale colonului, de a se multiplica în interiorul lor și de a se răspîndi în celulele adiacente, respectiv de a iniția cicluri repetate de invazie celulară, multiplicare, reinvazie, moarte celulară, distrugerea extensivă a epiteliului, ulcerații, reacții inflamatorii etc.

Primele cercetări au demonstrat că infectarea celulelor de mamifere este blocată la 30°C și că revenirea la fenotipul invadant are loc la 37°C și este asociată cu sinteza de proteine *de novo*.

Virulența este un fenomen multigenic. Maurelli (1989) citează, între fenotipurile asociate cu virulența la *Shigella* sp., reglate de temperatura de creștere, următoarele:

1) invazia celulelor cultivate de la mamifere;
2) invazia și producerea de keratoconjunctivită la cobai;
3) activitatea hemolitică de contact;
4) producerea de pigment pe agar—roșu de Congo;

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 552.

5) producerea de toxină *Shiga;*

6) sinteza a patru produși proteici ai genelor *ipa* (*i*nvasion *p*lasmid *a*ntigen): Ipa A (78 kdal), Ipa B (62,1 kdal), Ipa C (38,7 kdal); Ipa D (38 kdal).

În mod asemănător, la *Escherichia coli* sînt reglate, prin intermediul temperaturii, genele care codifică următorii produși esențiali pentru virulență:

1) antigenul $Vir^+$ (legarea de marginea „în perie" a celulelor);
2) pilii P;
3) pilii de tip 1;
4) antigenul piliar *pap A* (pielonefrită);
5) antigenele CFA/I, CFA/II și PCF 8775 (factori de colonizare);
6) capsula $K_1$ (rezistență la ser);
7) *tra T* (rezistență la fagocitoză).

Pe baza datelor existente, Maurelli (1989) a propus un model general de reglare termică a exprimării genelor *vir* (fig. 180), considerat corespunzător unui mecanism universal valabil pentru bacteriile patogene la om. Un rol esențial revine genei *vir R*, cartată pe cromosom între genele *gal U* și *trp*, care codifică o moleculă represor.

În cazul bacteriilor situate la temperaturi scăzute ($\leqslant 30°C$) în afara organismului uman (fig. 180 A), gena *vir R* este funcțională, produce molecule de

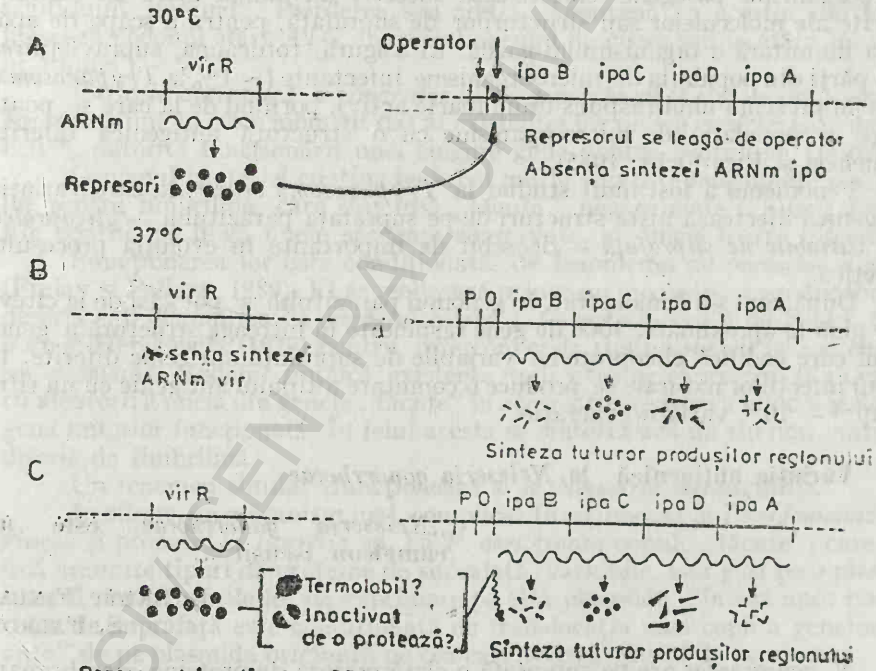



Fig. 180. — Model general privind mecanismul de reglare al genelor *vir R* la *Shigella* sp. **A.** Exprimarea genelor *vir R* la 30°C are ca rezultat producerea de molecule represor, care se leagă de regiunea operator a genelor reglate de *vir R* și blochează formarea de ARNm *ipa*. La 37°C, fie că genele *vir R* nu sînt transcrise și nu se produce represorul **(B)**, fie se produce un represor incapabil să se lege de operator (este termostabil sau inactivat de o protează) **(C)**. În ambele cazuri funcționează toate genele regionului, determinînd sinteza produșilor *ipa* (B, C, D, A) (după Maurelli, 1989).

proteine-represor, care se leagă de regiunea operator a genelor *vir* (figura ilustrează cazul particular al genelor *ipa*), și blochează formarea de ARNm *ipa* de virulență.

Cînd bacteriile sînt localizate în organism la 37°C există, teoretic, două posibilități de reglare:

1) Gena *vir R* este represată sub influența unui mecanism, încă nedescoperit, determinat de temperatura ridicată. Nu se sintetizează represor, genele operonului *ipa* sînt funcționale și, în consecință, sînt sintetizați toți produșii corespunzători care condiționează virulența (fig. 180 B).

2) Gena *vir R* este funcțională și codifică sinteza represorului, dar acesta nu se poate lega de operator pentru că este inactivat (fie este termolabil, fie este degradat de o protează). Și în acest caz sînt sintetizați toți produșii genelor *ipa* (B, C, D, A) (fig. 180 C).

## VARIAȚIA ANTIGENICĂ

Variația antigenică reprezintă mecanismul prin care anumite specii de microorganisme patogene sintetizează succesiv un număr mare de variante diferite ale moleculelor sau structurilor de suprafață, pentru a scăpa de apărarea imunitară a organismului-gazdă. El asigură, totdeauna, supraviețuirea unei părți din populația de microorganisme infectante (~ 1% la *Trypanosoma*, chiar în prezența unui răspuns imun foarte activ), pornind de la care se poate reface o populație de microorganisme cu o structură antigenică diferită (Donelson și Rice-Ficht, 1985).

Fenomenul a fost mult studiat la *Trypanosoma cruzi**, la care variația antigenică afectează niște structuri de pe suprafața parazitului — *glicoproteinele variabile de suprafață* — deosebit de importante în evoluția procesului infecțios.

După cum s-a demonstrat, în genomul parazitului se pot găsi de la cîteva sute pînă la aproximativ 1000 de gene răspîndite în întreaga structură a genomului care codifică glicoproteine variabile de suprafață antigenic diferite. În cursul infecțiilor naturale se produce o comutare a tipului antigenic cu un ritm de $10^{-5}$ — $10^{-6}$ variații/generație.

### Variația antigenică la *Neisseria gonorrhoeae*

„*Neisseria gonorrhoeae* este un cameleon iscusit"...

B. Brett Finlay
S. Falkow

*N. gonorrhoeae* are pe suprafață o clasă majoră de proteine membranare denumite P II, cu g.m. 24—32 kdal, cu rol esențial în aderența bacteriei de celulele epiteliale și în inițierea infecției. Celulele P II$^+$ au, pe lîngă rolul de mediatori ai aderenței, și o rezistență mai mare la antibiotice. Fiecare celulă de *N. gonorrhoeae* are capacitatea de a exprima numeroase specii de proteine P II, avînd, fiecare, o greutate moleculară și o structură antigenică diferite

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, p. 509.

(Schwalbe și colab., 1985; Owen, 1988). Pînă în prezent au fost localizate pe cromosomul bacterian nouă locusuri, fiecare capabil să codifice o variantă antigenic diferită a P II. Comutarea de la o variantă la alta s-ar face „spontan", cu o frecvență de $10^{-3}$/diviziune celulară.

Mecanismul variației antigenice este necunoscut.

După Heckels (1986), tranziția de la un tip antigenic la altul s-ar realiza *in vivo* sub influența anticorpilor. Răspunsul imun indus de varianta inițială, infectantă, a bacteriei ar determina apariția anticorpilor anti-P II față de tipul originar. Aceștia ar favoriza eliminarea celulelor sensibile, dar ar permite creșterea ulterioară a unei populații de bacterii noi, care exprimă un tip nou, antigenic, de P II, rezistent la anticorpi. Procesul s-ar repeta asigurînd menținerea infecției, deși răspunsul imun este de fiecare dată normal.

După Owen (1988), mecanismul molecular al acestui fenomen este următorul:

Transcrierea și traducerea fiecărei gene la o proteină P II funcțională are loc numai cînd codonul-start *ATG* este situat în cadrul normal de citire („in frame") a informației genetice*. Această poziție se realizează cu ajutorul unei unități structurale alcătuită dintr-un număr variabil de unități pirimidinice pentamere („Coding repeat") (CTCTT), care codifică porțiunea hidrofobă a peptidului „semnal". Pierderea sau adiția „spontană" a acestor unități deplasează codonul start *ATG* în cadrul normal de citire sau în afara lui („Out of frame").

*Variația antigenică a fimbriilor la N. gonorrhoeae.* Celulele de *N. gonorrhoeae* exprimă în orice moment dat al existenței lor un tip caracteristic de fimbrii**, datorită funcționării unei singure gene pentru fimbrilină (pilină).

Genomul bacteriei conține însă mai multe secvențe incomplete ale genelor pentru fimbrilină, care sînt însă „tăcute", neexprimate („Silent genes"). Ele conțin, pe lîngă unele secvențe conservate, și unele foarte diferite.

Funcționarea lor este condiționată de fenomenul de *conversie a genelor* (Finlay și Falkow, 1989). El se realizează printr-un mecanism asemănător celui descris sub denumirea de *modelul casetei* („Casette model") de Hicks, Strathern și Herskowitz (1977) pentru interconversia tipului sexual la *Saccharomyces cerevisiae.* Modelul implică existența unui situs de exprimare și a deplasării aleatorii a uneia din genele „tăcute" în acest situs, pentru a înlocui și deplasa gena anterior funcțională. În felul acesta se sintetizează un tip nou, antigenic diferit de fimbrilină.

Un fenomen similar funcționează și la *Neisseria meningitidis.*

În sfîrșit, un mecanism mai complicat funcționează la *Pseudomonas aeruginosa* și probabil la *Borrelia* sp. La *P. aeruginosa* copiile „tăcute", care codifică anumite tipuri de proteine de suprafață, variabile, s-ar găsi pe o plasmidă lineară, iar situsurile lor de exprimare pe altă plasmidă. Sinteza unor noi proteine de suprafață este condiționată de translocația unei copii a genelor „tăcute" de pe plasmida originară pe cea care poartă situsul de exprimare.

### Variația de fază a antigenelor flagelare la *Salmonella*

Iino și Kutsukake (1983) au descris un sistem de variație de fază, controlat genetic, la *Salmonella.* El are rol semnificativ în patogenitate și în apă-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 509.
** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, p. 517.

rarea de mecanismele imunitare, asigurînd supraviețuirea și multiplicarea bacteriilor în organismele-gazdă.

Variația de fază este un fenomen în cursul căruia un organism care poartă o anumită structură recunoscută imunologic (în cazul de față flagelul de la o tulpină de *Salmonella)* trece brusc de la un tip antigenic (faza 1) (în cursul subculturilor în laborator sau *in vivo)* la alt tip (faza 2). Ulterior, în cursul trecerilor succesive poate să treacă „înapoi" și „înainte" între cele două „faze".

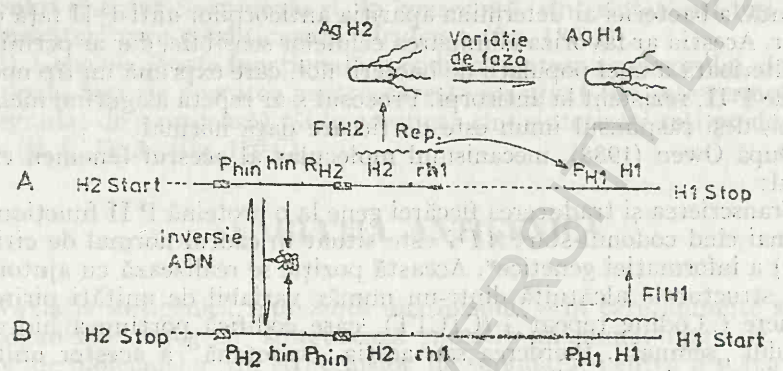



Fig. 181. — Reprezentarea schematică a mecanismului variației de fază a antigenelor flagelare (Ag $H_1$ și Ag $H_2$) de la *Salmonella* : Fl $H_1$ = flagelina $H_1$; Fl $H_2$ = flagelina $H_2$; Rep = proteină represor (după Smyth, 1988).

Din figura 181 rezultă că genele structurale $H_1$ și $H_2$, care codifică flagelina celor două tipuri de antigene flagelare ($AgH_1$ și $AgH_2$) au localizări separate pe cromosom. Exprimarea lor este controlată de orientarea unei regiuni din ADN situată în amonte de gena $H_2$, care poate avea două orientări (o secvență „inversabilă"; engl. „Invertible sequence"). Ea este delimitată de repetiții inverse*. În fiecare moment al existenței bacteriilor se exprimă o singură genă structurală, deci bacteriile au flageli alcătuiți fie din flagelina $H_1$, fie din flagelina $H_2$.

În orientarea din poziția A, sub controlul regiunii promotor $P_{H_2}$ este transcris operonul $H_2$ și se produce flagelină $H_2$. În același timp, sub influența genei rh1 este sintetizată o proteină represor *Rep*, care blochează transcrierea operonului $H_1$. Inversia și variația de fază se realizează printr-o recombinare omologă, sub controlul genei *hin* și a promotorului său $P_{hin}$, situați în regiunea inversabilă. În consecință, după cum rezultă din fig. 181 B, promotorul $P_{H_2}$ este separat de operonul $H_2$ pe care îl controlează și este prezent într-o orientare „rea". Ca urmare, operonul $H_2$ și produsul genei rh1 (Rep) nu sînt exprimate. În absența represorului începe sinteza flagelinei $H_1$ și a flagelilor de tip $H_1$.

Variația de fază a flagelilor, după Smyth (1988), cu rol deosebit de important în patogenitate, s-ar realiza aleatoriu o dată la fiecare $10^3$—$10^5$ generații.

Variația antigenică și de fază a microorganismelor reprezintă mecanisme genetice subtile, prin care patogenii dobîndesc avantaje deosebite, de la legarea eficientă de celulele gazdei la capacitatea de a se adapta la diferite medii

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 122.

în cursul infecției și de „a înșela" efectorii sistemului imun, reușind să supraviețuiască într-un mediu devenit ostil.

## Relația dintre patogenitate și parazitism

Relațiile dintre bacteriile patogene și organismele-gazdă sînt foarte variabile. Multe bacterii capabile să producă infecții invadante pot să se dezvolte în mediile naturale și chiar să intre în competiție cu microorganismele indigene. După cum remarcă Brubaker (1985), chiar unii patogeni considerați obligat paraziți și dependenți de o gazdă animală și, uneori de vectori (artropode), pentru asigurarea perpetuării lor în natură pot supraviețui perioade relativ extinse în unele medii naturale.

Dependența absolută de gazdă și incapacitatea de a prolifera în mediile naturale are la bază mecanisme puțin cunoscute, dar oricum deosebit de complexe ca, de exemplu:

1) existența unor exigențe nutriționale deosebit de complexe;

2) prezența unor mecanisme ineficiente de transport al nutrienților și de stocare a rezervelor;

3) asimilarea necorespunzătoare a $NH_4^+$ în legături organice;

4) mecanisme lente de reglare;

5) incapacitatea de a supraviețui condițiilor nutriționale neadecvate.

Paralel cu pierderea funcțiilor necesare pentru existența saprofită, adaptarea parazitară și capacitatea de multiplicare *in vivo* implică dobîndirea unor factori de virulență cu rolul de a evita sau chiar de a neutraliza mecanismele de apărare nespecifică ale gazdei.

Teoretic, apariția determinanților de virulență, care sînt codificați genetic, poate avea loc „intern", ca rezultat al unui proces îndelungat de evoluție cromosomală sau brusc prin dobîndirea unor elemente extracromosomale (plasmide, genomuri de fagi lizogeni), care poartă în structura lor „gene de virulență".

Ideea că modul de viață parazitară implică pierderea funcțiilor ce asigură supraviețuirea în mediile naturale are drept consecință, după Brubaker (1985), faptul că direcția de evoluție spre dependența de gazdă este ireversibilă și că selecția ulterioară va fi limitată spre o adaptare cît mai eficientă a dezvoltării *in vivo*. Situația extremă a acestei adaptări poate fi reprezentată de o toleranță reciprocă ce evoluează în direcția unei simbioze.

În acord cu această ipoteză se poate considera că mediul colonizat de o bacterie patogenă reflectă, în general, durata asocierii lui cu o anumită gazdă. În consecință, microorganismele „oportuniste" și cele parazitate facultativ sînt, de regulă, limitate la spațiile extracelulare *in vivo*, în timp ce speciile patogene cel mai bine adaptate sînt cel mai adesea capabile de creștere intracelulară.

Pe această bază au fost descrise trei categorii de bacterii parazite: 1) *parazite extracelulare*; 2) *facultativ intracelulare* și 3) *obligat intracelulare*.

1) **Bacteriile parazite extracelulare** colonizează, în mod normal, pielea și mucoasele, deși unele specii invadante se pot dezvolta în sînge și limfatice, iar uneori pot chiar invada spațiile interstițiale.

Supraviețuirea acestor bacterii *in vivo* este condiționată de rezistența lor la fagocitoză. De aceea, multiplicarea lor este asigurată fie prin colonizarea unor regiuni inaccesibile fagocitelor, fie prin sinteza unor substanțe cu acțiune antifagocitară de tipul leucocidinelor sau al polizaharidelor capsulare.

*Leucocidinele* sînt factori de virulență care omoară fagocitele „profesioniste"*. Au fost descrise la un număr important de bacterii patogene *(Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa)*. Este probabil că cele mai multe exotoxine (cu excepția neurotoxinelor și enterotoxinelor) au oarecare potențial leucotoxic. Acțiunea lor se exercită prin intermediul stimulării lizei intracelulare a lizosomilor, avînd ca efect moartea fagocitelor.

*Capsula* exercită o acțiune antifagocitară complexă acționînd pe mai multe căi: 1) ca barieră fizico-chimică, împiedicînd legarea factorilor opsonizanți de suprafața celulei bacteriene; 2) blocînd contactul celulelor bacteriene cu receptorii celulelor fagocitare; 3) exercitînd un efect chimiotactic negativ; 4) împiedicînd depunerea complementului pe suprafața bacteriilor; 5) este slab imunogenă și maschează structurile parietale subiacente care sînt imunogene și ar putea activa complementul.

Importanța capsulei în patogenitate este evidentă în cazul unor bacterii ca: *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* ș.a., ale căror mutante necapsulate sînt avirulente (Finlay și Falkow, 1989).

2) **Bacteriile patogene parazite facultativ intracelular** au capacitatea de a coloniza și de a se multiplica în medii utilizate de cele parazite extracelular și, în plus, pot pătrunde în multe celule ale organismului-gazdă.

Sînt capabile să pătrundă în fagocitele „neprofesioniste" și să supraviețuiască în macrofage. Au o mare afinitate pentru mecanismele catabolice oxidative, care reflectă, probabil, condițiile de tensiune de $O_2$ prezente în citoplasma celulei.

După Brubaker (1985), acestea sînt de două tipuri:

*Bacteriile „specializate"* sînt capabile să pătrundă și să se multiplice în fagocitele „neprofesioniste" sau în alte tipuri de celule, dar nu și în macrofage. Un exemplu tipic este reprezentat de *Shigella* sp. care parazitează celulele epiteliului intestinal. În mod asemănător, *Neisseria gonorrhoeae* se multiplică în celulele stratului columnar al epiteliului genital uman și, potențial, și în țesutul subepitelial, datorită prezenței unui lipopolizaharid.

*Parazitismul facultativ intracelular „generalizat"* corespunde bacteriilor capabile să se multiplice în fagocitele „profesioniste" și, uneori, să devină rezidenți stabili ai acestora. *Salmonella typhimurium*, spre exemplu, se multiplică lent în macrofage, dar și în fagocite „neprofesioniste", rezistînd contactului cu enzimele litice în vacuolele fagosomale. Rezistența lor la acțiunea acestora ține de prezența lipopolizaharidelor pe suprafața celulară, a antigenului Vi, de sinteza activă de enterochelină. În mod asemănător, *Mycobacterium tuberculosis* rezistă datorită producției masive a sideroforilor, structurilor de suprafață celulară și prezenței factorului „cord" (trehaloză-6, 6'-dimicolat) și unor lipide cu S, care împiedică fuziunea fagolizosomală.

3) **Bacteriile parazite obligat intracelulare** se dezvoltă exclusiv în celule vii, deși pot supraviețui perioade lungi de timp și în mediile extracelulare. Dependența lor de celula-gazdă are la bază cauze diverse, în mare parte încă necunoscute. Cel mai mult studiate sînt bacteriile din genurile *Mycobacterium, Chlamydia, Rickettsia* și *Coxiella*.

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, p. 184.

# MICROORGANISMELE OPORTUNISTE

**„Este probabil că pe măsură ce vor supraviețui tot mai multe gazde compromise imunologic și pe măsură ce vom cunoaște mai bine mecanismele intrinsece de apărare ale organismului uman, vor fi recunoscute tot mai multe microorganisme „oportuniste" și tot mai multe condiții predispozante".**

A. VON GRAEVENITZ

Sub denumirea de microorganisme oportuniste sînt reunite un număr important de microorganisme (bacterii, microfungi, protozoare) diferite, care produc infecții unor gazde compromise sub raportul capacității lor de apărare, datorită unor defecte fie locale, fie generale ale mecanismelor de apărare antimicrobiană. Ele utilizează oportunitatea oferită de slăbirea mecanismelor de apărare pentru a produce îmbolnăviri, uneori deosebit de severe ale organismelor-gazdă.

Conceptul de microorganism oportunist este destul de ambiguu. Astfel, după Peloux (1985), definiția nu exclude inducerea bolii la o gazdă a cărei apărare normală este copleșită de mărimea dozei infectante sau de virulența extremă a microorganismelor respective.

După von Graevenitz (1977), microorganismele oportuniste pot produce trei tipuri de infecții: 1) exclusiv la gazde compromise imunologic (de exemplu, *Mycobacterium avium, Corynebacterium equi)*; 2) mai frecvent la gazde compromise decît la cele normale *(Staphylococcus, Salmonella)*; 3) mai severe la gazdele compromise decît la cele normale *(Mycoplasma pneumoniae, Salmonella)*.

Microorganismele care produc boala numai la gazde neimunizate natural sau artificial (prin vaccinare, ca, de exemplu, *Corynebacterium diphteriae)* nu sînt oportuniste.

„Oportuniștii" nu sînt identici cu saprofiții (ca, de exemplu, *Clostridium botulinum)* care trăiesc pe materiale organice în descompunere și nu pot competiționa cu microbiota din organismul normal. Dar, oportuniștii pot fi saprofiți (de exemplu, *Nocardia* sp.). Ei nu sînt identici cu microbiota normală, dar unii membri ai acesteia sînt capabili să producă infecții oportuniste.

Pentru precizarea statutului de microorganism oportunist, von Graevenitz ia în considerație următoarele condiții:

1) microorganismul trebuie să fie izolat de mai multe ori, din leziunile semnificative clinic, la gazde compromise;

2) el trebuie să fie semnificativ mai frecvent prezent și izolat în circumstanțele respective decît în restul populației, comparabil din alte puncte de vedere;

3) asocierea nu trebuie să fie determinată de o circumstanță care afectează atît sensibilitatea gazdei, cît și microorganismul;

4) asocierea să nu fie indirectă. Spre exemplu, s-a demonstrat că salmonelozele sînt mai frecvente și mai severe la gastrectomizați decît la indivizii martori cu aceeași vîrstă și sex.

BCU CLUJ TRANSILVANIA UNIVERSITY LIBRARY

Relația nu este specifică celor două stări (gastrectomie și infecție), ci este determinată de hipoclorhidria consecutivă intervenției chirurgicale, care scade efectul bactericid al sucului gastric.

## Cauzele predispozante ale infecțiilor oportuniste

**„Cunoașterea mecanismelor care deschid calea invaziei microorganismelor oportuniste este incompletă".**

A. VON GRAEVENITZ

Lista condițiilor ce predispun la infecții oportuniste este foarte mare și greu de completat. Unele sînt determinate genetic, altele sînt consecutive altor boli sau iatrogene (tratamente imunosupresoare sau antibiotice cu spectru larg).

Între cele mai importante sînt de menționat, după Graevenitz (1977), următoarele: defecte legate de funcția celulelor B (cel mai important agamaglobulinemia Bruton, hipogamaglobulinemiile); defecte ale limfocitelor T (sindromul Di George, hipoplazia timică); deficiențele asociate ale limfocitelor T și B, granulomatoza cronică, sindromul leucocitelor „leneșe", neutropeniile, bolile limfoproliferative (leucemii limfocitare cronice, reticulosarcom, mielom multiplu etc.); leucemiile acute mielogene, deficiențe ale unor componenți ai sistemului complement, boala Hodgkin, lupusul sistemic eritematos, anemia falciformă, sindroamele nefrotice și insuficiența renală, alcoolismul, malnutriția, insuficiența hepatică, marile traumatisme chirurgicale și arsurile, abuzul de droguri, bolile cronice pulmonare (bronșite, bronșectazii, emfizem, obstrucții) etc.

Dintre cauzele iatrogene sînt de menționat: imunosupresia (chimioterapia citotoxică pentru celulele T, B, leucocite) consecutivă transplantului de organ, chimioterapia și radioterapia anticanceroasă, disbiozele microbiotei intestinale după administrarea orală a unor antibiotice cu spectru larg etc. De asemenea, cateterismele urinare, cateterele de dializă, valvulele cardiace protetice etc.

## Bacteriile implicate în infecții oportuniste

Lista bacteriilor oportuniste este extrem de lungă și încă neexhaustivă. Enumerarea cîtorva dintre ele, după revista generală elaborată de van Graevenitz (1977), este importantă pentru a demonstra nu numai enorma diversitate sistematică, ci și gradul de ignorare a prezenței lor în infecțiile respective.

Imensa majoritate a bacteriilor oportuniste nu apar, niciodată, pe buletinele de analiză ale laboratoarelor de specialitate, fiind etichetate greșit sau considerate drept contaminante. Cele întîlnite mai frecvent sînt următoarele: *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus (Herella vaginicola)* sau var. *lwoffi (Mima polimorpha)*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes* sp., *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *Bacteroides fragilis*, *B. melaninogenicus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Cardiobacterium hominis*, *Clostridium septicum*, *C. perfringens*, *Corynebacterium aquaticum*, *C. pseudodiphteriti-*

*cum, C. xerosis, Dermatophilus congolensis* (actinomicetă), *Eikenella corrodens, Enterobacteriaceae (Escherichia* sp., *Salmonella, Edwardsiella, Enterobacter cloacae, E. aerogenes, E. agglomerans (Erwinia herbicola), Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, P. rettgeri, Providencia stuartii, Serratia marcescens, Shigella* sp., *Yersinia enterocolitica, Y. pseudotuberculosis), Flavobacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae, Lactobacillus casei* var. *rhamnosus, L. plantarum, Listeria monocytogenes, Moraxella lacunata, M. liquefaciens, M. nonliquefaciens, Mycobacterium tuberculosis, M. kansasii, M. avium, M. fortuitum, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis, N. subflava, N. perflava, Nocardia* sp., *Pasteurella multocida, Plesiomonas shigelloides, Pseudomonas aeruginosa, P. cepacia, Spirillum, Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Streptococcus pyogenes* grup A, *S. agalactiae, S. pneumoniae* etc.

### Infecțiile oportuniste în patogenia sindromului imunodeficitar dobîndit (SIDA)

Infecțiile oportuniste prezente în sindromul imunodeficitar dobîndit (fr. SIDA — *s*yndrome *i*mmuno*d*éficitaire *a*cquis; engl. AIDS = *a*cquired *i*mmuno*d*efficiency *s*yndrome) reprezintă un caz cu totul aparte, deosebit de important din punct de vedere teoretic și practic. Atît particularitățile clinice, cît și evoluția bolii sînt determinate de natura microorganismelor implicate, de cea a virusurilor și de localizarea lor în organism, precum și de modificările patologice pe care le induc la situsurile lor de acțiune.

Virusul HIV tip 1 (Human immunodeficiency virus) infectează cu predilecție limfocitele $T4^+$ ($TCD4^+$), numite, după funcția lor, T helper ($T_H$)*, cu rol fundamental în coordonarea întregii activități a sistemului imunitar.

În mod normal, numărul limfocitelor $T4^+$ este de $\sim 1000/mm^3$. Urmărirea unui număr important de cazuri de SIDA a demonstrat că apariția și natura infecțiilor oportuniste de-a lungul bolii pînă la sfîrșitul letal sînt corelate cu numărul limfocitelor $T4^+$ în sînge (Mills și Masur, 1990). Imediat după producerea infecției cu virusul HIV tip 1, numărul limfocitelor $T4^+$ ($T_H$) scade în medie cu $40—80/mm^3$/an. Cînd numărul lor ajunge la $400/mm^3$ apar primele infecții oportuniste. Inițial ușoare, relativ benigne, afectînd pielea și mucoasele, ulterior chinuitoare (afte, inflamații dureroase ale mucoasei bucale cu *Candida albicans)*, zona zoster, micoze fungice severe (,,picior de atlet''), leucoplazii bucale produse de virusul *Epstein-Barr* etc.

Apariția acestor infecții corespunde stadiului bolii cunoscut sub denumirea *ARC (A*IDS *r*elated *c*omplex) ,,complexul asociat (înrudit) cu SIDA'', în fapt, o stare pe care o putem denumi *pre-SIDA*.

Pe măsură ce numărul celulelor $T4^+$ continuă să scadă apar infecții oportuniste mai grave. Cînd numărul limfocitelor $T_H$ ($T4^+$) este mai mic de $200/mm^3$ apar infecțiile cu *Pneumocystis carinii, Cryptococcus, Cryptosporidium* și *Toxoplasma*, iar cînd acest număr scade la $\sim 100$ celule/$mm^3$ apar infecțiile cu citomegalovirusuri (fig. 182).

Practic, principalii agenți patogeni ce se comportă ca oportuniști pe fondul deficitului imunitar indus de virusurile HIV sînt următorii:

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, p. 291.

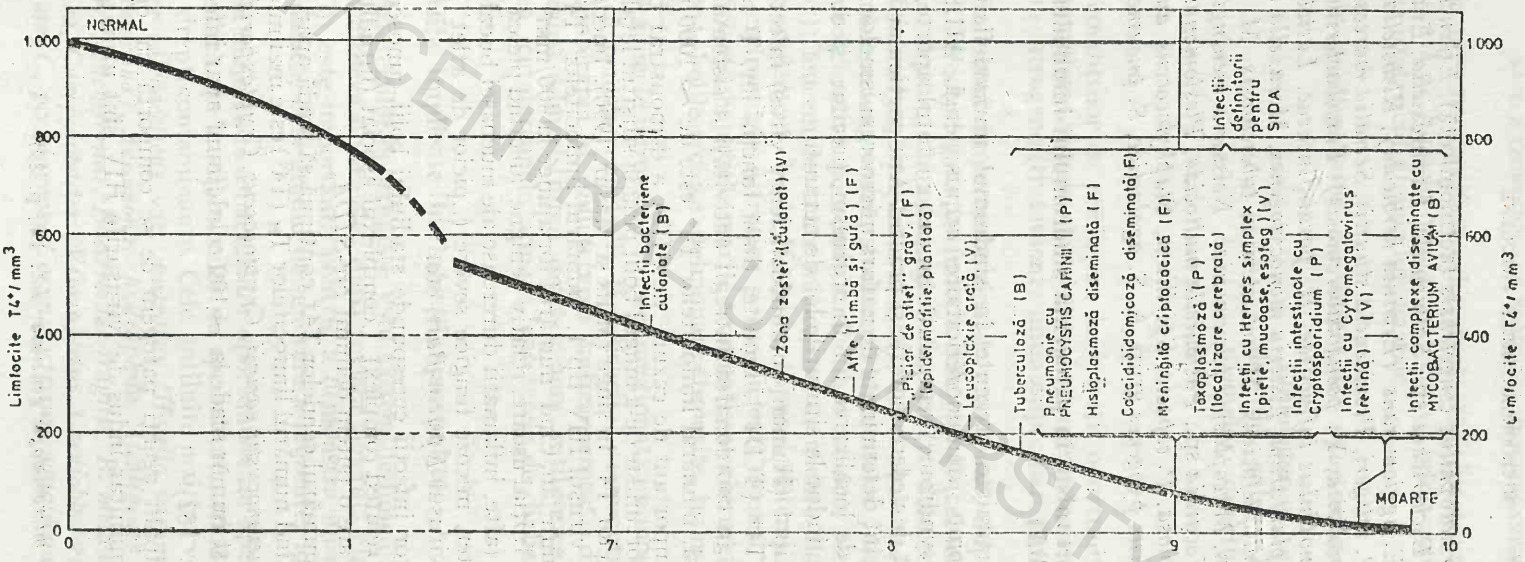



Fig. 182. — Succesiunea infecțiilor oportuniste la persoane cu deficit imunitar consecutiv infecției cu virusul HIV: V = infecții virale; B = bacteriene; F = fungice; P = cu protozoare (după Mills și Masur, 1990).

BCU IASI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

**Virusuri:** *Herpesvirus simplex* I și II (leziuni extensive, ulceronecrotice peribucale și perianale); *Herpes zoster* (leziuni extensive și necrotice); *Papovavirus* (encefalite progresive multifocale); *Cytomegalovirus* (retinite, pneumopatii, infecții gastrointestinale).

**Bacterii:** *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (tuberculoză pulmonară extensivă); *Mycobacterium avium* var. *intracellulare*, prezente ubicvitar în sol, praf, crescătoriile de păsări, lapte, incapabile să infecteze omul normal sau afectat de stări imunodeficitare de altă natură. Aceasta din urmă este patogenă exclusiv pentru bolnavii de SIDA (produce infecții grave diseminate în pulmon, ficat, măduva oaselor, intestin, sînge. Nu declanșează reacții de imunitate celulară și fenomene inflamatorii).

**Fungi:** *Candida albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. famata* (infecții gastrointestinale); *Pityrosporum (Malassezia) ovale* (leziuni cutanate ale pielii capului și feței; *Cryptococcus neoformans* (meningită purulentă), *Histoplasma capsulatum* (septicemii).

**Protozoare:** *Pneumocystis carinii* (pneumonie interstițială); *Toxoplasma gondii* (abcese cerebrale diseminate); *Cryptosporidium* (infecții intestinale).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# TOXINELE BACTERIENE

Ideea că unele manifestări patologice sînt produse de anumite substanțe chimice („Sepsine") a fost formulată prima dată de Kless (1872), în cazul leziunilor produse de stafilococ.

Koch (1884) a descris holera ca o toxicoză, pe baza faptului că agentul patogen rămîne în intestin, fără să invadeze structurile acestuia și nici țesuturile învecinate, precum și pe observația că administrarea orală a filtratului de cultură reproduce boala, în timp ce pe cale parenterală este inofensiv.

Löffler (1880) demonstrează că, în mod asemănător, *Corynebacterium diphteriae* rămîne în nasofaringe și este, în general, absent din organele interne, care sînt cele mai afectate de leziunile produse la distanță de locul infecției.

Roux și Yersin (1888) folosesc primii termenul de toxină, pe care o consideră „un fel de enzimă".

În prezent, termenul descrie orice substanță toxică de proveniență biologică, respectiv sintetizată de bacterii, fungi (micotoxine), celule vegetale sau animale (tabelul nr. 31).

Termenul de *otravă* este rezervat substanțelor chimice organice sau anorganice (stricnină, săruri de Hg, As etc.), care introduse într-un organism (pe cale orală, parenterală) produc leziuni celulare sau tisulare, perturbarea sau suspendarea unor activități fiziologice normale și, în funcție de doză, chiar moartea organismului.

## CLASIFICAREA TOXINELOR

Au fost propuse mai multe sisteme de clasificare a toxinelor. Probabil, faptul că nici unul nu răspunde exigențelor unei clasificări riguros științifice explică utilizarea curentă (cu toată ambiguitatea sa) a conceptului dualist de împărțire în *exotoxine* (toxine extracelulare) și *endotoxine* (legate de structura celulei).

Bazat pe primele observații, respectiv pe prezența toxinelor în filtratul acelular sau pe necesitatea de a le elibera din celulele bacteriene după dezintegrare sau autoliză, acest concept a fost consolidat de diferite alte particularități (natura bacteriilor producătoare, natura chimică a toxinelor, gradul de toxicitate și efectele farmacodinamice diferite etc.). Toate aceste particularități explică utilizarea curentă a acestei clasificări, deși ea nu-și mai păstrează integral validitatea.

BCU „VICTOR BABEȘ" / UNIVERSITY LIBRARY

*Tabelul nr. 31*

**Exemple de toxine proteice de origine bacteriană, vegetală sau animală**
(din Gill, 1982)

| Organismul | Numele toxinei | Doza letală /kg corp | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Șoarece | Cobai | Om |
| **I. PROTEINE BACTERIENE** | | | | |
| *Bacillus anthracis* | Factorul letal | < 114 µg i.v. | | |
| *Bacillus cereus* | Cereolizina | 40—80 µg | | |
| *Bordetella pertussis* | Pertusigen (termostabilă) | 15—21 µg i.p. | | |
| *Clostridium botulinum* tipul A | Neurotoxina | 1,2 ng i.p. | 0,6 ng | ~ 1 ng |
| *Clostridium perfringens* | α-toxina, lecitinaza | 3 µg i.v. | | |
| *Clostridium tetani* | Tetanospasmina | 1 ng | 0,3 ng | <2,5 ng |
| *Corynebacterium diphteriae* | Toxina diferică | 1,6 mg s.c. | 160 ng s.c. | ≤ 100 ng i.m. |
| *Escherichia coli* | Enterotoxina termolabilă | 250 µg i.v. | | |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Toxina A | 3 µg i.v. | | |
| *Shigella dysenteriae* | Neurotoxina | 1,3 µg i.p. | >9 µg i.v. | |
| *Staphylococcus aureus* | α-toxina | 40—60 ng i.v. | | |
| | α-lizina | | | |
| *Streptococcus pyogenes* | Toxinele pirogene, eritrogene | 3,6 mg i.v. | | |
| *Vibrio cholerae* | Toxina holerică (holeragen) | 250 µg | | |
| **II. PROTEINE VEGETALE** | | | | |
| *Abrus precatorius* (semințe) | Abrina | 700 ng i.v. | 400—500 ng | >300 ng |
| *Ricinus communis* (semințe) | Ricina | 2,7 µg i.v. | < 1,1 µg | >500 ng |
| **III. PROTEINE ANIMALE** | | | | |
| Neurotoxine presinaptice | | | | |
| *Oxyuranus scutellatus* | Taipoxina | 2 µg i.v. | | |
| *Bungarus multicinctus* | β-bungarotoxina (fosfolipază) | 14 µg i.v. | | |
| | | 40 µg s.c. | | |
| *Crotalus* | Crotoxina (fosfolipază) | 82 µg i.v. | | |
| *Notechia scutatus* | Notexina (fosfolipaza) | 25 µg i.v. | | |
| Neurotoxine postsinaptice | | | | |
| *Naja hage* | Neurotoxina | 50 µg s.c. | | |
| *Bungarus caeruleus* | Caeruleotoxina | 53 µg | | |
| Scorpion | diferite neurotoxine | 9—144 µg s.c. | | |
| *Cnidaria* | Toxine din nematochiști. | 33—70 µg i.v. | | |
| Toxine letale | | | | |
| Tetraodontidae (peștele „glob") | Tetradotoxina | | | 10 µg/kg |

BCU IAȘI CENTRU UNIVERSITY LIBRARY

**Exotoxinele** (toxinele extracelulare) îndeplinesc obligatoriu trei condiții:

a) sînt prezente în mediul de cultură separat de celulele bacteriene care le-au produs;

b) eliberarea lor nu necesită autoliza sau producerea de leziuni ireversibile ale celulelor producătoare care continuă să crească și să se multiplice;

c) nu se acumulează în celulele producătoare.

Criteriile se aplică exclusiv celulelor tinere, deoarece cele bătrîne pot prezenta fenomene de autoliză sau permeabilitate crescută a învelișurilor celulare.

**Toxine intracelulare:** toxine localizate în citoplasmă și respectiv legate sau situate *în* membrana plasmatică, dar, oricum în interiorul barierei de permeabilitate reprezentată de această structură anatomică. Ele pot fi eliberate numai după îndepărtarea peretelui celular, prin distrugere mecanică sau extracție chimică.

**Toxinele legate de suprafața celulei** sînt situate în afara membranei citoplasmatice. Ele corespund endotoxinelor clasice elaborate de *Enterobacteriaceae*, care fac parte integrantă din membrana externă a peretelui celular sau toxinelor legate mai mult sau mai puțin lax de suprafața externă a celulei, fără a face parte structural din peretele celular.

Raynaud și Alouf (1970) propun următoarea clasificare a toxinelor bacteriene în raport cu compoziția lor chimică și localizarea în celule:

**Grupul I:** *Toxine proteice intracitoplasmatice* ale bacteriilor Gram-negative: sînt eliberate după ruperea mecanică, enzimatică, autolitică a învelișurilor celulare sau prin extracție chimică. Prezente la *Bordetella pertussis, Shigella dysenteriae* (neurotoxina), *Yersinia (Pasteurella) pestis.*

**Grupul II:** *Toxine lipopolizaharidopolipeptidice* (glucidolipidopolipeptidice-endotoxine) din peretele celular al bacteriilor Gram-negative. Prezente tipic la *Enterobacteriaceae.*

**Grupul III:** *Exotoxine proteice adevărate: Vibrio cholerae, Clostridium tetani, Corynebacterium diphteriae.*

**Grupul IV:** *Toxine proteice* cu localizare intra- și extracelulară în cursul fazei logaritmice de creștere. Prezente la *Clostridium tetani, C. botulinum, C. oedematiens, C. sordelii.*

De asemenea, Raynaud (1970) propune o clasificare pragmatică, bazată exclusiv pe compoziția chimică, fără a ține seama de localizarea sau raportul cu celula producătoare sau de natura bacteriilor:

1) **Toxinele proteice** reprezentate de exotoxinele produse de bacteriile Gram-pozitive și de toxinele proteice intracelulare ale unor bacterii Gram-negative: *Bordetella pertussis, Yersinia pestis, Shigella* (neurotoxina).

2) **Toxinele glucidolipidopolipeptidice** corespunzînd endotoxinelor „adevărate" (antigene somatice), produse tipic de *Enterobacteriaceae.*

## Terminologie

*Pretoxina* (engl. „Protoxin", Bonaventre și Kempe, 1960; „Prototoxin", Dolman, 1970): precursor imediat, sintetizat inactiv (ca și tripsinogenul sau pepsinogenul). Molecula biologic inactivă poate deveni toxică prin diferite procese, inclusiv prin expunerea la o acțiune enzimatică.

*Activare:* proces ce determină modificări răspunzătoare de producerea unei toxicități noi sau mărite. Poate fi *calitativă* (producerea unei toxine active dintr-o moleculă în stare netoxică) sau *cantitativă* (creșterea toxicității preexistente).

*Toxine simple:* moleculă toxică *per se*, alcătuită exclusiv din aminoacizi. Pot exista ca monomere, dimere sau polimere, dar agregatul toxic constă din subunități *identice*, cu toxicitate egală și efect cantitativ aditiv. Acționează direct pe celule sensibile sau țesuturi. Produc simptome specifice și efect letal în funcție de doză.

*Toxinele multicomponente* sînt de două tipuri, greu de diferențiat experimental:

*Toxine complexe:* toxine formate din două sau mai multe componente. Devin funcționale (toxice) numai după ce componenții lor au fost reuniți prin legături chimice corespunzătoare (legături covalente, legături de H), înainte de a-și manifesta toxicitatea. Componenții individuali nu au toxicitatea complexului. Testați separat, nu prezintă nici una din activitățile biologice asociate cu toxina completă.

*Amestec toxic:* produs a cărui toxicitate este determinată de mai mulți componenți, care își păstrează identitatea și nu formează complexe chimice. Fiecare component are o funcție unică și poate acționa independent asupra țesuturilor gazdei. Pot acționa pe același situs sau pe situsuri diferite. Suma activităților lor reprezintă toxicitatea globală. Spre exemplu, unul mărește permeabilitatea capilarelor, favorizînd pătrunderea celorlalte componente în situsuri inaccesibile. Toxina produsă de *Bacillus anthracis* conține 3 componenți sinergic activi: Factorul I, netoxic *per se*, produce edem al pielii la iepure și omoară șoarecele asociat cu factorul II. Factorul III, nefetal *per se*, sau amestecat cu II, mărește letalitatea amestecului I + II.

## TOXICITATEA

Efectul toxinelor bacteriene este de cele mai multe ori foarte mare (vezi tabelul nr. 30). Astfel, toxina botulinică de tip D este de trei milioane de ori mai puternică decît stricnina luată ca etalon, iar toxinele tetanică, neurotoxina *Shigella dysenteriae* și toxina botulinică purificată și cristalizată tip A sau B, de un milion de ori. Efectul toxic este variabil nu numai în funcție de specia bacteriană producătoare, ci și de tulpină, chiar pe medii optime. În multe cazuri, toxigeneza se atenuează sau chiar dispare în subculturi repetate.

La unele specii *(Corynebacterium diphteriae, Bacillus cereus, Staphylococcus* sp., ca și la *Shigella dysenteriae* pentru neurotoxină), toxigenitatea este asociată cu lizogenia.

În general, efectul toxinelor este variabil în funcție de natura, vîrsta, greutatea, sexul, linia genetică a animalelor pe care sînt testate, ca și de tehnica și calea de administrare folosite.

În unele cazuri, toxicitatea este dependentă și de natura probei de toxină folosită. Astfel, Lamanna și Glassman (1947) au demonstrat că unele probe de toxină botulinică sînt de 6 000 de ori mai toxice pentru cobai decît pentru șoarece, iar altele numai de trei ori.

Există, de asemenea, și unele diferențe de sensibilitate la nivel celular: astfel, fosfolipaza C (α-toxina) produsă de *Clostridium welchii* lizează rapid

hematiile de oaie și numai lent pe cele de cal, în timp ce fosfolipaza C (γ-toxina) produsă de *C. oedematiens* se comportă invers.

În general, datele referitoare la toxigeneză se referă la administrarea lor parenterală, deoarece cu excepția enterotoxinelor, toxinele uzuale sînt distruse de modificările de pH sau de activitatea enzimelor digestive.

Pe baze pur teoretice, literatura de specialitate citează mai multe date sugestive (nu însă și riguros exacte) pentru marea toxicitate a toxinelor bacteriene:

1) toxina botulinică de tip A purificată și cristalizată ar conține într-un miligram 1 200 000 DLM (doze limită mortale) pentru 1 kg/corp cobai, ceea ce înseamnă că 1 mg toxină poate să omoare 1 200 tone de cobai sau două milioane de șoareci;

2) 100—198,422 g neurotoxine (botulinică sau tetanică) ar putea omorî întreaga populație a globului.

Aceste date, deși sugestive, pornesc de la premisa inexactă că toate animalele au o sensibilitate egală și că doza letală este direct proporțională cu sensibilitatea animalelor. Ele reprezintă rezultatul „unui exercițiu în mare măsură fără sens", după opinia celui care le-a calculat (van Heyningen, 1970).

## Sinteza și eliberarea toxinelor

Deși numărul datelor disponibile este foarte mare, cunoștințele privind locul de formare, reglarea sintezei și mecanismul de eliberare în mediul înconjurător al exotoxinelor sînt încă necunoscute. Au fost formulate mai multe ipoteze bazate în special pe unele particularități specifice enzimelor extracelulare. Prin analogie se poate considera că exotoxinele sînt sintetizate la suprafața celulei bacteriene.

Astfel, prezența fosfatazei alcaline în spațiul periplasmic la *E. coli* sugerează că membrana plasmatică ar putea conține constituenții necesari pentru asamblarea aminoacizilor în proteine chiar pe fața externă a membranei. Timpul scurt necesar pentru sinteza toxinei difterice (3 minute) și pentru eliberare (30 secunde) pledează pentru această ipoteză (Uchida și Yoneda, 1967; Raynaud și Alouf, 1970).

Transferul prin peretele celular, respectiv prin rețeaua peptidoglicanică, ar la bacteriile Gram-negative și prin membrana externă pare să nu pună probleme speciale. Exotoxinele bacteriene au, de regulă, molecule relativ mici, cu puține legături disulfidice și o mică rigiditate, ceea ce ar facilita transferul lor prin învelișurile celulare (Pollock și Richmond, 1962). Transferul este facilitat de o serie de mecanisme care pot acționa sinergic: 1) încorporarea în membrana celulară intactă și expulzarea de partea opusă prin modificări alternative de creștere și descreștere a presiunii laterale pe membrana celulară; 2) degradarea parțială a peretelui celular prin acțiunea unor autolizine; 3) creșterea permeabilității învelișurilor celulare indusă de exotoxine; 4) în cazul difuziei prin membrane nealterate structural sau funcțional, intervenția unor mecanisme chimice mai complexe care ar putea include o excretază.

În cazul endotoxinelor situația este, cel puțin teoretic, mai simplă: ele reprezintă constituenți ai membranei externe a peretelui celular al bacte-

riilor Gram-negative, iar eliberarea lor este condiționată de autoliza sau distrugerea pe cale fizică sau chimică a celulei bacteriene.

### Activarea toxinelor

Multe toxine bacteriene sînt sintetizate și eliberate în mediu într-o formă ca atare netoxică (pretoxine).

Activarea lor se realizează pe mai multe căi:

1) Prin clivarea moleculelor mari netoxice pe cale enzimatică la subunitățile componente cu rol specific în legarea de celulele sensibile și internalizare și în fragmente toxice (de exemplu, toxinele difterică, holerică etc.).

2) Producerea de modificări intramoleculare care pot determina tranziția de la netoxic la o stare toxică sau creșterea toxicității preexistente. Teoretic, procesul se poate realiza prin reducerea numărului de aminoacizi sau prin modificări conformaționale, neînsoțite de pierderi de aminoacizi.

3) Îndepărtarea unui component netoxic sau antidot dintr-un complex sau agregat care conține atît molecule toxice, cît și netoxice.

4) Modificarea stării fizice a moleculelor toxice ca, de exemplu, dezagregarea cristalelor netoxice parasporale de la *Bacillus thuringiensis*, precum și de la speciile și variantele înrudite, la proteinele monomere foarte toxice sub influența modificărilor de pH (pH > 10,0).

## EXOTOXINELE BACTERIENE

**„Exotoxinele bacteriene pot induce, direct sau indirect, leziuni tisulare pe suprafața epiteliilor, în țesuturile subepiteliale sau în organele interne"**

J. P. Arbuthnott

Convențional, exotoxinele sînt definite ca substanțe toxice solubile, avînd următoarele particularități:

1) Sînt sintetizate și eliberate în mediul extern numai de celulele care cresc activ, respectiv în faza logaritmică și de încetinire a ritmului de creștere (fig. 183). Concentrația lor nu crește semnificativ în faza staționară sau în cele ulterioare.

2) Apar în mediul extern fie imediat după debutul sintezei, fie după o anumită perioadă.

3) Concentrația intracelulară este neglijabilă (pînă la 1—5% din concentrația extracelulară).

4) Sînt de natură proteică.

5) Sînt elaborate de bacterii Gram-pozitive.

6) Comparativ cu alte substanțe toxice, exotoxinele bacteriene au o toxicitate foarte mare, atît în stare brută, cît și, mai ales, în stare purificată.

Exotoxina botulinică de tip A, purificată și cristalizată, conține într-un mg 1 200 000 DLM (doze limită mortale) per kg corp cobai; 1 mg de toxină omoară 1 200 tone de cobai sau două milioane de șoareci. După calculele lui van Heyningen (1964), 198,422 g din această exotoxină ar fi suficientă pentru a omorî toată populația globului.

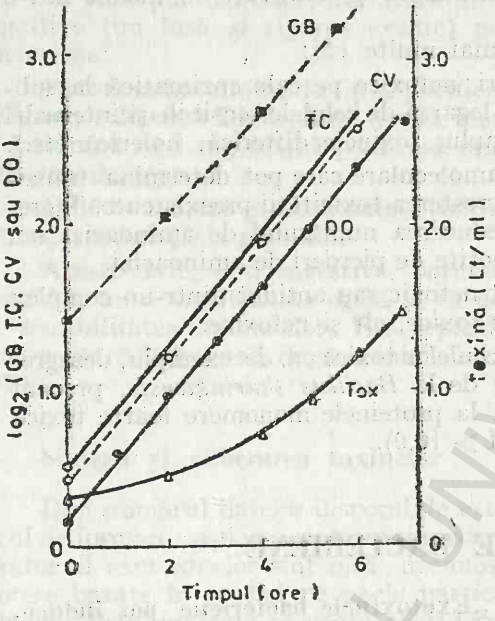



Fig. 183. — Producerea de toxină difterică în cursul fazei de creștere logaritmică de către *Corynebacterium diphteriae*. Eliberarea toxinei este reprezentată de curba „Tox" marcată cu triunghiuri: GB = greutatea bacteriilor uscate; Tc = total celule; CV = celule viabile; DO = densitatea optică (după Hirai și colab., 1965).

7) Efectul biologic al exotoxinelor este specific și este datorit afinității lor caracteristice pentru anumite celule-țintă ale organismului (tabelul nr. 32).

8) Sub influența combinată a formolului 0,4 % și a căldurii (39—40°C), exotoxinele se transformă în toxoid (anatoxine). Produs lipsit complet de toxicitate, toxoidul păstrează intacte proprietățile antigenice specifice ale exotoxinei din care provine. De aceea, introdus parenteral în organismul uman sau animal, toxoidul determină formarea de anticorpi de tipul antitoxinelor, capabili să neutralizeze complet efectele toxice ale exotoxinei originare.

Deși aceste particularități sînt, în general, admise ca definitorii, observații mai recente confirmă ambiguitatea conceptului de exotoxine, datorită unor particularități care se abat de la contextul definit. Astfel unele toxine (tetanică, botulinică pot persista în celule (fig. 184, 185).

După cum s-a demonstrat, sinteza toxinelor proteice nu este limitată exclusiv la bacteriile Gram-pozitive, deoarece ele sînt prezente intracelular la unele bacterii Gram-negative *(Shigella dysenteriae, Vibrio cholerae, Bordetella pertussis)*. În plus, toxinele proteice intracelulare pot fi găsite în filtratele de cultură sau în supernatantele culturilor pe medii lichide, mai ales în culturi vechi, lizate. Din această cauză, după Raynaud și Alouf (1970), termenul de exotoxină trebuie limitat la toxinele existente în mediu, provenite din celule care nu au suferit modificări structurale mai mari decît cele maxime compatibile cu procesele normale de creștere și multiplicare.

Toxinele prezente în mediu după ce celulele în care s-au format au fost distruse sau lizate (deci, după ce și-au pierdut arhitectura esențială pentru creștere și activități biologice) nu pot fi considerate ca riguros extracelulare (exotoxine).

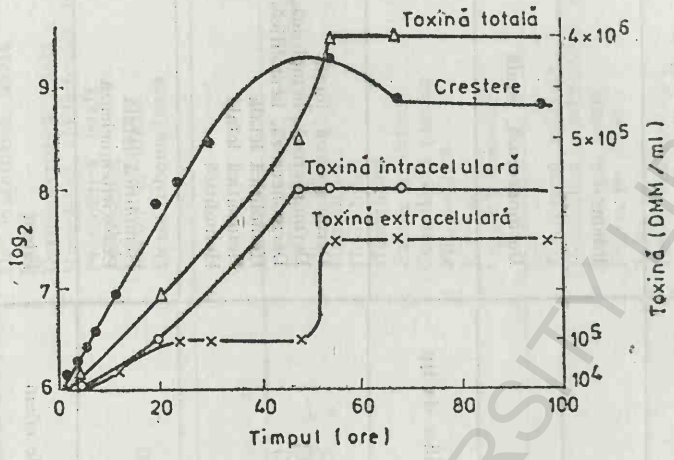



Fig. 184. — Corelația dintre toxigeneza extracelulară și intracelulară, în urma cultivării bacteriei *Clostridium tetani* în eprubete închise etanș (după Raynaud și colab., 1955).

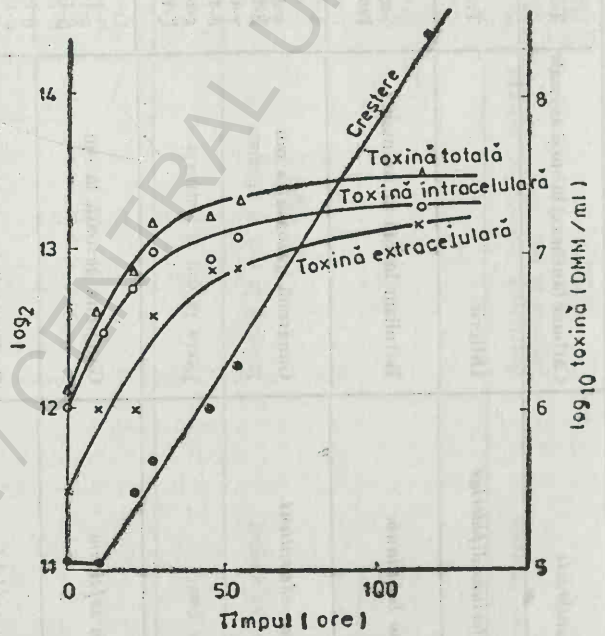



Fig. 185. — Creșterea bacteriei *Clostridium tetani* în saci de celofan și corelația dintre cantitatea de toxină intra- și extracelulară (după Raynaud și Alouf, 1970).



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

*Tabelul nr. 32*

**Principalele bacterii patogene producătoare de toxine şi efectele acestora**
(după date din literatură)

| Specia bacteriană | Maladia | Toxinele produse | Efectele majore |
|---|---|---|---|
| *Bacillus anthracis* | Cărbune (anthrax) la om şi animale | Toxină complexă | Edem |
| *Corynebacterium diphteriae* | Difterie | Toxina Shiga | Dermonecroză, letală |
| *Clostridium botulinum* | Botulism la om şi animale | Şase neurotoxine specifice de tip hemaglutinină | |
| *Clostridium oedematiens* | Gangrenă gazoasă la om | α-toxină<br>β-toxină (fosfolipaza C)<br>γ-toxină (fosfolipaza C)<br>δ-toxină (lipază)<br>ε-toxină (lipază)<br>ζ-toxină | Dermonecroză, letală<br>Dermonecroză, hemolitică, letală<br>Dermonecroză, hemolitică, letală<br>Hemolitică letală<br>Hemolitică letală<br>Hemolitică |
| *Clostridium septicum* | Gangrena gazoasă la om | α-toxină<br>β-toxină | Hemolitică letală<br>Dezoxiribonucleză |
| *Clostridium sordelii* | Gangrena gazoasă la om | Toxina producătoare de edem | Edem |
| *Clostridium tetani* | Tetanos la om şi animale | Hemoragină<br>Tetanospasmină<br>Neurotoxina nespasmogenă<br>Tetanolizina | Hemoragii<br>Neurotoxină<br>Netoxică (?)<br>Cardiotoxică, hemolitică, letală |

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIBLIOTECA

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Clostridium welchii* | Gangrenă gazoasă, enterită necrotică la om enterotoxuria la oaie | α-toxină (fosfolipaza C)<br>β-toxină<br>γ-toxină<br>δ-toxină<br>ε-toxină<br>η-toxină<br>ο-toxină<br>θ-toxină<br>k-toxină (colagenază)<br>λ-toxină<br>μ-toxina (hialuronidază)<br>Dezoxiribonucleză | Dermonecrotică, hemolitică, letală<br>Letală<br>Letală<br>Letală<br>Dermonecrotică, letală<br>Letală<br>Dermonecrotică, letală<br>Hemolitică, cardiotoxică, letală<br>Protcolitică, letală<br>Protcolitică<br>Factor de difuzie<br>Dezoxiribonucleză |
| *Pasteurella pestis* | Pesta la om și animale | Toxină complexă | |
| *Staphylococcus aureus* | Infecții la om și animale | α-toxină<br>β-toxină (fosfolipaza C)<br>γ-toxină<br>δ-toxină<br>ε-toxină<br>Hialuronidază<br>Stafilocoagulază<br>Stafilokinază<br>Enterotoxină<br>Leucocidină | Dermonecrotică, hemolitică, letală<br>Hemolitică<br>Hemolitică<br>Hemolitică<br>Hemolitică<br>Factor de difuzie<br>Coagulează plasma<br>Fibrinolitică<br>Emetizantă<br>Omoară leucocitele |
| *Streptococcus pyogenes* | Scarlatină, amigdalite, infecții piogene la om | Toxina Dick<br>Streptolizina O<br>Streptolizina S<br>Hialuronidază<br>Streptokinază<br>Streptodornază<br>Hemoragină | Eritrogenă, neletală<br>Hemolitică, cardiotoxică, letală<br>Hemolitică, letală<br>Factor de difuzie<br>Fibrinolitică<br>Dezoxiribonucleză |
| *Shigella dysenteriae* | Dizenterie la om | | |
| *Vibrio cholerae* | Holeră la om | Enterotoxină<br>Hemolizină | Diaree |

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

## TOXINA DIFTERICĂ

Este, în realitate, o proteină fagică, deoarece este codificată de o genă situată în structura fagului temperat β, de la *Corynebacterium diphteriae*. Ca atare este produsă numai de tulpinile β-lizogene. Tulpinile bacteriene netoxigene pot fi convertite la patogenitate prin lizogenizare cu gena *tox*$^+$ a fagului β.

**Arhitectura moleculară.** Toxina difterică intactă este o proteină globulară (g.m. 63 kdal), enzimatic inactivă, sintetizată și eliberată din celule ca un polipeptid unic. Nu conține aminoacizi neobișnuiți și nici porțiuni neproteice. Conformația spațială este menținută prin două punți disulfidice (S—S). Molecula intactă inactivă poate fi ușor clivată („Nicked") prin ruperea unei legături peptidice la nivelul unei regiuni sensibile la proteaze. Molecula incizată, activă *in vivo*, este alcătuită din două catene polipeptidice reunite printr-o legătură disulfidică (fig. 186).

După tratare cu un agent reducător cele două catene sînt complet separate, formînd fragmentele A și B. Acest proces are loc și în mod natural *(in vivo)*. Deasemenea, el se produce și în mediile de cultură în care ~ 20% din toxina pură este, în mod obișnuit, incizată înainte de expunerea la tripsină sau pronază, sub acțiunea proteinazelor bacteriene.

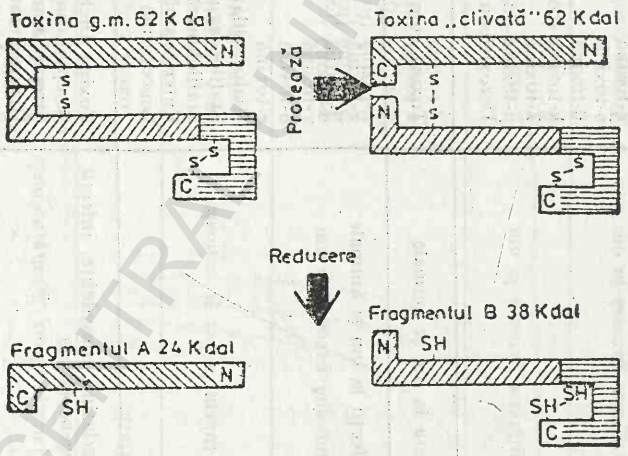



Fig. 186. — Structura toxinei difterice și modul de formare a fragmentelor A și B (după Bizzini, 1976).

*Fragmentul A* („Activity") (g.m. 24 kdal) corespunde porțiunii active a toxinei. Este foarte stabil, rezistă la 100°C și la pH 2,0—12,0, fără pierderea activității. În celule rezistă ~ 80% în 24 de ore.

*Fragmentul B* („Binding") (g.m. 39 kdal), mai hidrofob, mai puțin stabil, mediază legarea de un receptor specific de pe suprafața celulelor, favorizînd internalizarea toxinei.

**Pătrunderea toxinei în celule.** Deși mult studiat, mecanismul de pătrundere a toxinei difterice în celule are încă unele aspecte incomplet lămurite.

Modalitatea cea mai obișnuită este endocitoza mediată de receptori, în care toxina se leagă, inițial, de membrana celulară, prin intermediul frag-

mentului B. Ulterior are loc internalizarea complexului toxină/receptor în vezicule endocitare (Morris și Saelinger, 1986).

Numărul receptorilor este variabil: ~ 4 000/celulă HeLa, $5—10 \times 10^4$/celulă Vero, $10^5 — 2 \times 10^5$ per celule renale de la *Cercopithecus aethiops* (fig. 187). Este probabil că numărul și afinitatea lor pentru toxină explică

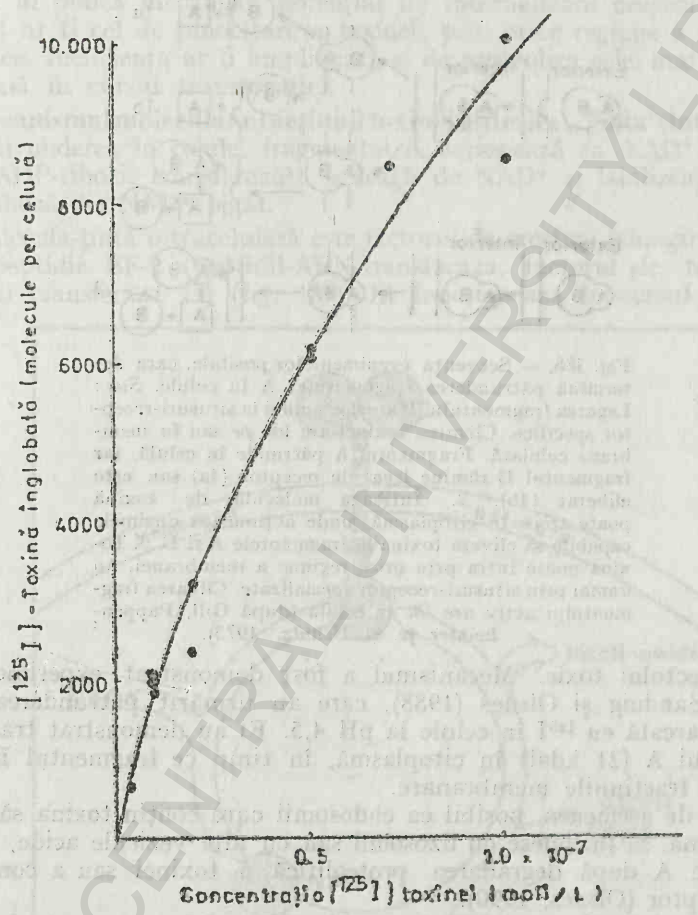



Fig. 187. — Relația dintre concentrația toxinei difterice marcate cu $^{125}I$ în mediu și dinamica legării sale de celulele HeLa (după Boquet, 1976).

diferențele mari de sensibilitate între diferite organisme (de ~ un milion de ori între cele mai sensibile și cele mai puțin sensibile).

Natura lor este, probabil, glicoproteică, deoarece tratarea celulelor Vero cu concentrații mici de tripsină scade capacitatea celulelor de a lega toxina, dar această capacitate este anulată și de fosfolipaza C (Olsnes, 1985; Olsnes și colab., 1990). Fragmentul B, a cărui funcție principală este de purtător al fragmentului activ prin membrana celulară, poate rămîne, uneori,

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

inserat, blocînd receptorul pentru utilizări ulterioare sau poate fi eliberat în mediu (fig. 188).

După Gill și Pappenheimer jr. este posibil ca ambele fragmente să pătrundă în citoplasmă, unde se găsesc enzimele capabile să cliveze toxina la cele două fragmente A și B. Procesul este absolut necesar pentru mani-

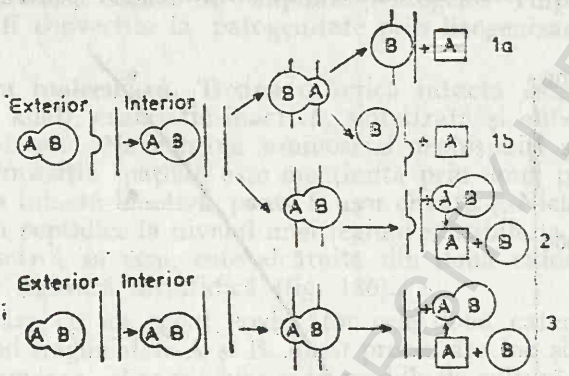



Fig. 188. — Secvența evenimentelor posibile, care determină pătrunderea fragmentului A în celule. *Sus*: Legarea fragmentului B are loc numai la situsuri-receptor specifice. Clivarea toxinei are loc *pe* sau *în* membrana celulară. Fragmentul A pătrunde în celulă, iar fragmentul B rămîne legat de receptor (1a) sau este eliberat (1b). 2. Întreaga moleculă de toxină poate trece în citoplasmă, unde acționează enzimele capabile să cliveze toxina la fragmentele A și B. 3. Toxina poate intra prin orice regiune a membranei, nu numai prin situsuri-receptor specializate. Clivarea fragmentului activ are loc în celulă (după Gill, Pappenheimer jr. și Uchida, 1973).

festarea efectului toxic. Mecanismul a fost demonstrat experimental de Moskaug, Sanduig și Olsnes (1988), care au urmărit pătrunderea toxinei difterice marcată cu $^{125}I$ în celule la pH 4,5. Ei au demonstrat translocația fragmentului A (21 kdal) în citoplasmă, în timp ce fragmentul B rămîne asociat cu fracțiunile membranare.

Este, de asemenea, posibil ca endosomii care conțin toxina să migreze în citoplasmă, să fuzioneze cu lizosomii sau cu alte vezicule acide, eliberînd fragmentele A după degradarea proteolitică a toxinei sau a complexelor toxină/receptor (Olsnes, 1990).

Morris și Saelinger (1986) au evidențiat rolul important al valorilor de pH ale mediului. Endocitoza și translocarea prin membrană au loc imediat ce pH din endosomi ajunge la valori $< 5,3$. Tratamentul celulelor cu un număr mare de compuși care măresc valoarea pH în endosomi protejează celulele de intoxicare.

Energia necesară pentru transportul fragmentului A în celulă este furnizată de gradientul protonic. Durata internalizării este de aproximativ 25 minute (Middlebrook și Dorland, 1984). Este probabil că o singură moleculă de fragment A este suficientă pentru a leza ireversibil o celulă sensibilă. (Collier, 1975).

Experimental s-a demonstrat, pe modele artificiale, reprezentate de sisteme lipidice dublu stratificate, că inserția toxinei produce canale trans-

membranare (∅ 0,5 nm), care sînt prea mici pentru a asigura translocația fragmentului A, chiar dacă acesta a suferit o modificare conformațională ireversibilă, la o formă denaturată extinsă (Middlebrook și Dorland, 1984). Recent s-a demonstrat că aceste „canale" produse de toxina difterică și de fragmentul B funcționează selectiv pentru cationii monovalenți ($H^+$, $K^+$, $Na^+$) și doar ineficient pentru cationii divalenți (Olsnes și colab., 1990).

Un al doilea mecanism potențial de internalizare nespecific, lent și ineficient ar fi cel de pinocitare a toxinei, prin orice regiune a membranei plasmatice. Ineficiența ar fi amplificată și de proteoliza celei mai mari părți din toxină în cursul translocației.

**Mecanismul molecular al acțiunii toxinei difterice „Ținta" intracelulară.** După pătrunderea în celule, fragmentul A acționează ca $NAD^+$-glicohidroxilază (ADP-ribozil transferază): se leagă de $NAD^+$ și labilizează legătura $NAD^+$/riboză din $NAD^+$ legat.

Molecula-țintă intracelulară este factorul de creștere (alungire) al lanțului polipeptidic EF-2 (peptidil-ARN-translocaza, factorul de transfer sau aminoacil transferaza II) (fig. 189). El funcționează în cursul biosintezei

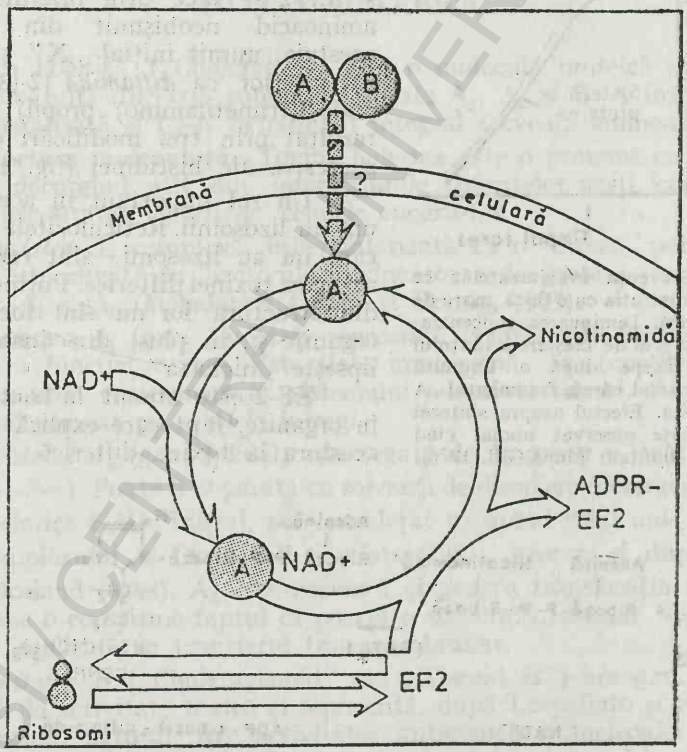



Fig. 189. — Modul de interacțiune al toxinei difterice cu celulele intacte. După eliberarea în citoplasmă, fragmentul A interacționează cu NAD. Complexul format reacționează cu factorul EF-2 pentru a forma adenozin-difosforiboză-EF-2 (ADPR—EF-2). În absența EF-2 funcțional, sinteza proteinelor este blocată, ceea ce antrenează degradarea celulei (după Gill, Pappenheimer jr. și Uchida, 1973).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

proteinelor *, acționînd în deplasarea fizică a ARN, care poartă polipeptidul, de la situsul acceptor ribosomal la situsul donator, cu mențiunea ARN „în fază" (deci, asigurînd traducerea corectă a informației genetice). În acest scop, EF-2 circulă *de la* și *la* ribosomi, fiind alternativ „legat" sau „liber". El este protejat de inactivare numai dacă este legat de ribosomi. Dacă se disociază, ori se leagă de alt ribosom, ori este inactivat. Reacția globală este:

$$\text{EF-2} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{ADPR} - \text{EF-2} + \text{NAD}^+ + \text{H}^+$$

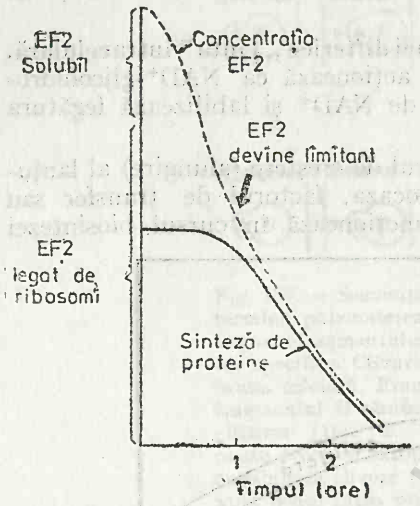



Fig. 190. — Secvența evenimentelor ce determină intoxicația cu o doză mare de toxină difterică. Diminuarea concentrației EF-2 (factorul de creștere a lanțului polipeptidic) începe după o anumită perioadă în cursul căreia fragmentul A intră în citosol. Efectul asupra sintezei proteinelor este observat numai cînd EF-2 devine limitant (după Gill, 1976).

Legat covalent de un rest de adenozin-difosforiboză, EF-2 este incapabil să asigure sinteza proteinelor (nu se mai poate lega de ribosomi, nu hidrolizează GTP (guanozin-5-trifosfat) cu rol important în translocație) (fig. 190).

Van Ness, Howard și Bodley (1980) au demonstrat că legătura dintre $NAD^+$ și EF-2 se face prin intermediul unui aminoacid neobișnuit din structura acestuia, numit inițial „X" și identificat ulterior ca *diftamidă* [2-(3-carboxiamido-3(trimetilamino) propil) histidină], rezultat prin trei modificări enzimatice succesive ale histidinei (fig. 191).

Un rol important în această acțiune au lizosomii. Reticulocitele de iepure, care nu au lizosomi, sînt rezistente la acțiunea toxinei difterice. Puținele enzime din structura lor nu sînt localizate în organite și, în plus, din ansamblul lor lipsește „nickaza".

EF-2 este absent la bacterii, ca și în organite, fapt care explică rezistența acestora la toxina difterică.

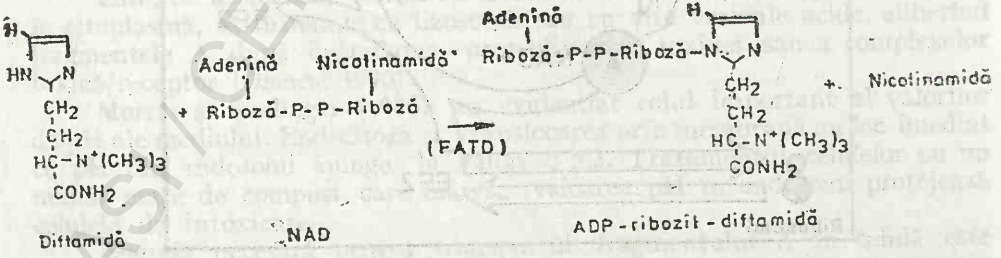



Fig. 191. — Activitatea enzimatică a fragmentului A al toxinei difterice. El clivează NAD și leagă covalent ADP-riboza de un aminoacid unic — diftamida — prezent numai în structura factorului de creștere a lanțului proteic EF-2, pentru a forma ADP-ribozil-diftamidă (după Olswes și colab., 1990).

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 262.

**Patogenitatea și semnificația biologică.** Sintetizată de bacteriile localizate la nivelul naso-faringelui, toxina diftерică circulă prin sînge și limfatice, atacînd toate celulele expuse, inclusiv organele interne la distanță, cu necroze tisulare micro- și macroscopice în miocard, rinichi, ficat, pulmon, sistem nervos etc. Leziunile sînt nespecifice.

Tulpinile netoxigene pot supraviețui perioade îndelungate în căile respiratorii superioare, producînd infecții ușoare sau cu severitate moderată.

Eliberarea toxinei de către bacteriile lizogene reprezintă un avantaj selectiv pentru bacterii, deoarece lezarea căilor respiratorii superioare, facilitează colonizarea epiteliilor necrozate și, de asemenea, favorizează diseminarea infecției în natură prin tuse și strănut (Collier, 1975).

Deși sinteza și eliberarea toxinei măresc severitatea infecției, simpla capacitate de a produce toxină nu este suficientă pentru supraviețuirea bacteriei sau pentru patogenitate. Tulpina PW-8, foarte toxigenă, utilizată în laborator pentru producerea toxinei, este avirulentă.

## TOXINA HOLERICĂ

Toxina holerică („Choleragen") este o moleculă proteică mare (g.m. 82 kdal), alcătuită din trei subunități notate $A_1$, $A_2$ și B. A fost obținută în stare cristalizată și i s-a determinat integral secvența aminoacizilor.

**Arhitectura moleculară.** Toxina holerică este o proteină cu un design complicat, decurgînd atît din interacțiunile diferitelor părți componente, cît și din necesitatea legării de celulele eucariote.

*Subunitatea A*, complexă, este sintetizată ca o catenă polipeptidică unică. Ea este clivată în bacteriile producătoare de proteaze în alte două subunități: $A_1$ și $A_2$ (Mekalanos, Collier și Romig, 1979).

*Subunitatea* $A_1$ (g.m. 29 kdal) reprezintă componenta biologic activă, purtătoare a funcției toxice. Este slab imunogenă. Are funcția de ADP-ribozilare a unui component al sistemului adenilat ciclazei. Separată, are un efect neînsemnat pe celulele întregi.

*Subunitatea* $A_2$ (g.m. 5 kdal) este legată de $A_1$ printr-o legătură disulfidică (—S—S—). Poate fi separată cu solvenți de disociere (detergenți, guanidină hidroclorică 6 M). Inițial, s-a considerat ca avînd rolul unic de stabilizare a complexului A. După Gill și colab. (1981), precum și după Middlebrook și Dorland (1984), $A_2$ este necesară și pentru translocația toxinei în celulă. Proba o constituie faptul că poartă o secvență „semnal" de proteină secretorie, implicată în transferul transmembranar.

*Subunitatea B* („Choleragenoid" sau „Toxoid H") are g.m. 56 kdal, este lipsită de activitate toxică și reprezintă, după Lospalluto și Finkelstein (1972), toxoidul natural. Are activitatea antigenică a moleculei native și capacitatea de a inhiba competitiv proprietatea toxinei de a bloca situsurile receptor. Este alcătuită din 5 subunități identice (g.m. 11,6 kdal). Modul de grupare a subunităților este puțin cunoscut. Are funcția de legare a toxinei de membrana celulară.

Figura 192 prezintă schematic modelul lui Gill (1976), care ar explica legarea de receptori și translocația prin membrana celulară.

După van Heyningen (1977), singura geometrie posibilă a toxinei holerice este bazată pe legarea stabilă a celor cinci subunități B, în acord cu principiile interacțiunilor proteină — proteină și asocierea lor cu subunitatea complexă A.

Figura 193, bazată pe observații electronomicroscopice, sugerează că subunitatea A ($A_1$+$A_2$) este legată de „inelul" format de cele cinci subunități B mai degrabă prin $A_2$ decît prin $A_1$. Or, este puțin probabil că subunitatea $A_2$ să fie suficient de mare pentru a lega simultan toate cele cinci subunități B.

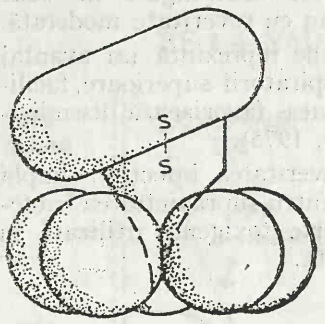



Fig. 192. — Reprezentarea schematică a modulului probabil de grupare a subunităților din structura toxinei holerice (după Hill, 1976).

După Middlebrook și Dorland (1984) este probabil că subunitățile B ar fi aranjate în cerc în jurul unei regiuni centrale în care se găsește $A_1$. $A_2$ conectează subunitatea $A_1$ de B printr-o singură legătură disulfidică, ce trebuie desfăcută pentru a asigura exprimarea toxicității maxime. În felul acesta, subunitatea $A_2$ ar funcționa ca o piesă adaptoare care servește pentru legarea subunității A de B.

Cele cinci componente ale subunității B ar beneficia de interacțiuni interne foarte puternice (în fiecare subunitate) și de interacțiuni între subunități suficient de puternice pentru a rezista la disocierea cu detergenți.

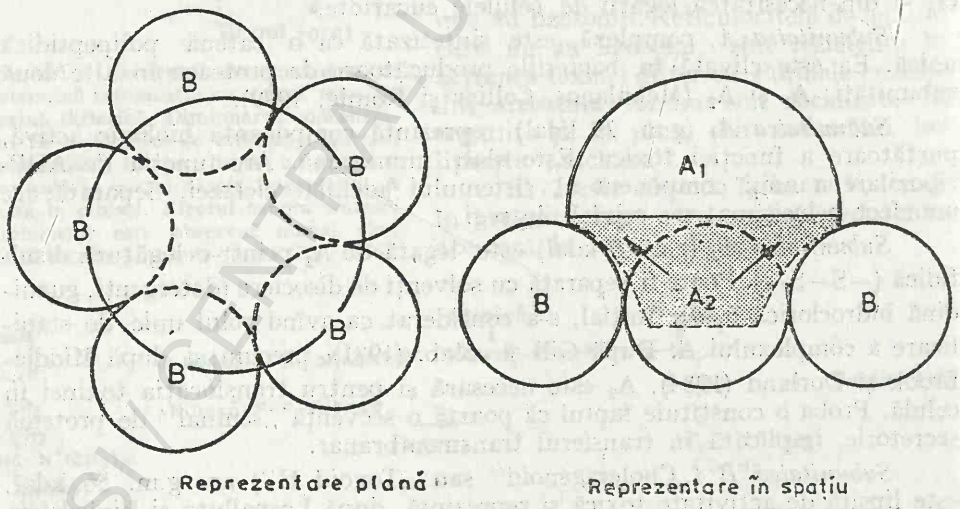



Fig. 193. — Reprezentarea schematică a modului posibil de aranjare a subunităților componente în toxina holerică (după van Heyningen, 1977).

Sinteza toxinei holerice este controlată și reglată de genele *tox* cromosomale, localizate pe harta genetică în grupul de gene *his*. Subunitatea A și B ar fi sintetizate separat în citoplasmă pe polisomi liberi. Asamblarea lor într-o moleculă unică se face în spațiul periplasmic, din care sînt eliberate foarte eficient în mediul înconjurător.

**Pătrunderea toxinei în celule.** Mecanismul principal de înglobare a toxinei holerice în celule este endocitoza mediată de receptori. După Sahyoun și Cuatrecasas (1975), inițial s-ar lega de gangliozide o singură subunitate B. Ulterior ar avea loc o difuzie laterală în planul membranei celulare, pînă cînd toate cele cinci subunități ale toxinei s-ar asocia cu cinci gangliozide. Deplasarea laterală a complexelor toxină/$G_{M1}$ este demonstrată de cel puțin două fenomene: 1) împiedicarea deplasării complexului cu ajutorul antitoxinei blochează efectul toxic; 2) în intestin, toxina holerică se leagă de marginea în perie a celulelor mucoasei. Or, adenilat ciclaza este localizată exclusiv pe suprafețele laterale și bazală ale celulelor. Deci, pentru a-și exercita acțiunea, toxina trebuie să se deplaseze în jurul suprafeței celulare, după ce s-a legat. În cursul deplasării complexului toxină/receptor, în planul membranei s-ar realiza o redistribuire a receptorilor, cu formarea de ,,petice'' (,,Patch'') și ,,bonete'' (,,Capping'') *. Bonetarea ar favoriza asocierea complexului toxină/receptor cu o proteină membranară integrată, care ar favoriza translocația complexului în celulă.

Al doilea mecanism posibil de încorporare a toxinei holerice se bazează pe unele probe experimentale, care demonstrează apariția unor alterări conformaționale ale toxinei, după legarea de receptori. Legarea subunității B ar induce modificări de permeabilitate a membranei și în plus ,,inelul'' B s-ar deplia, favorizînd formarea unui ,,canal'' în structura acesteia.

Subunitatea A, eliberată de constrîngerile impuse de restul subunităților proteice cu care a fost asociată, poate interacționa cu membrana lipidică, pentru a trece prin ea, deoarece este plasată exact lîngă stratul lipidic, într-o poziție favorizată pentru a pătrunde prin ea.

Figura 194 este bazată pe ipoteza lui van Heyningen (1977), după care fragmentele B s-ar deplia, intrînd în membrana celulară pentru a crea un ,,tunel'' de subunități B, de-a lungul căruia trece subunitatea A. Aceasta poate trece și singură, dar formarea unui tunel ar favoriza transferul.

Eliberarea segmentului activ $A_1$ în celulă se face prin clivarea legăturilor S—S. Agentul reducător natural este glutationul, fapt care explică de ce legăturile S—S supraviețuiesc rar în mediul intracelular.

**Mecanismul de acțiune.** Toxina holerică acționează producînd ADP-ribozilarea unui component al sistemului adenilat ciclazei. Acest component este reprezentat de subunitatea de reglare a sistemului respectiv.

Adenilat ciclaza este o enzimă multisubunitară, localizată pe fața internă a membranelor celulare, avînd componentul catalitic în contact cu citosolul. Ea poate exista în două forme: *activă* și *inactivă*, datorită unui component reglator cunoscut sub denumiri diferite ca: proteina G, proteina G/F sau proteina $N_s$ a ciclazei, și care are un situs de legare pentru GTP.

În stare activă, adenilat ciclaza are un rol esențial în modularea concentrației AMPc, cu efecte directe asupra metabolismului celular, după reacția ATP $\leftrightharpoons$ AMPc + PPi.

În absența activatorului ciclazei, concentrația AMPc revine rapid la normal, datorită enzimei AMPc-fosfodiesteraza, prezentă în mod permanent în celule. Ea are rolul de a hidroliza AMPc la AMP. În felul acesta, concentrația AMPc în celule este, în orice moment, rezultatul a două efecte opuse: al adenilat ciclazei și al fosfodiesterazei.

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, p. 355.

Totodată, Kieffer și colab. (1975) au demonstrat că toxina holerică ar inhiba guanilat ciclaza și ar scădea concentrația GMPc în celulă. S-ar realiza, astfel, un dezechilibru al celor doi produși cu importanță fundamentală pentru celulă, AMPc și GMPc, a căror concentrație, după cum se știe, oscilează în sens opus: cînd unul crește, celălalt scade.

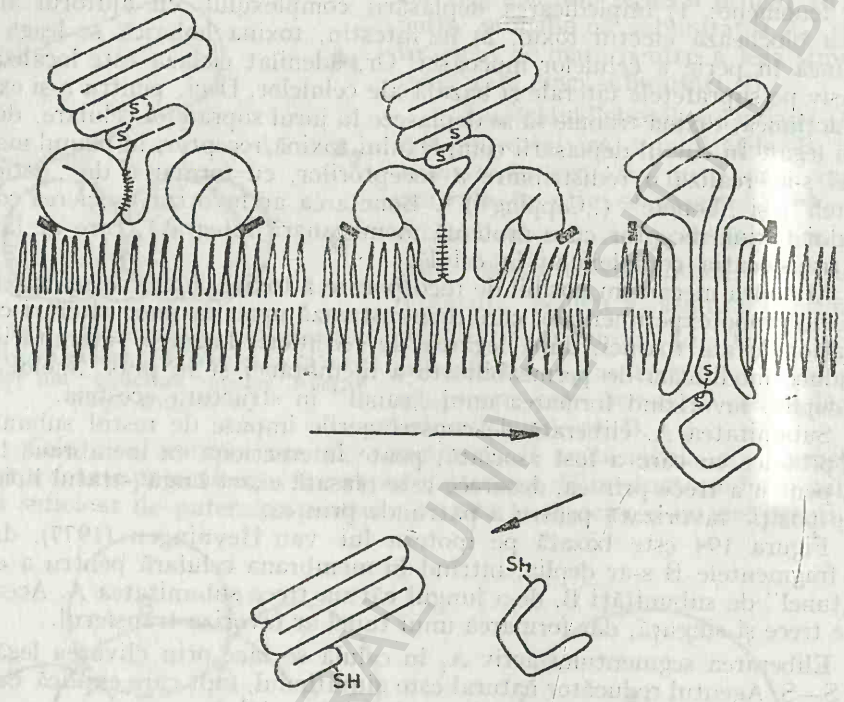



Fig. 194. — Reprezentarea schematică a modului în care subunitățile B ale toxinei holerice își schimbă conformația (după ce inițial s-au legat de receptorii membranari), pentru a forma un canal prin care componentul A poate trece prin membrana celulară (după Gill, 1976).

Sintetizînd aspectele moleculare ale acestui proces, pe baza datelor mai recente, Middlebrook și Dorland (1984), precum și Arbuthnott (1988) propun următoarea schemă de evoluție:

Complexul proteină G/GTP interacționează cu componentul catalitic al ciclazei, pentru a forma un sistem ternar activ în sinteza AMPc de la ATP. Hidroliza GTP la GDP convertește proteina de reglare G la o formă care nu mai activează unitatea catalitică. Pentru a reactiva sistemul enzimatic, are loc disocierea G/GDP, urmată de legarea, din nou, a GTP de situsul originar.

Funcțional, ADP-ribozilarea proteinei de reglare G de către toxina holerică (subunitatea $A_1$) convertește această proteină la o stare incapabilă de a determina hidroliza GTP. Or, inhibarea activității GTPazice determină o activare persistentă a componentului catalitic al ciclazei.

Rezultatul final este creșterea concentrației AMPc în celulă.

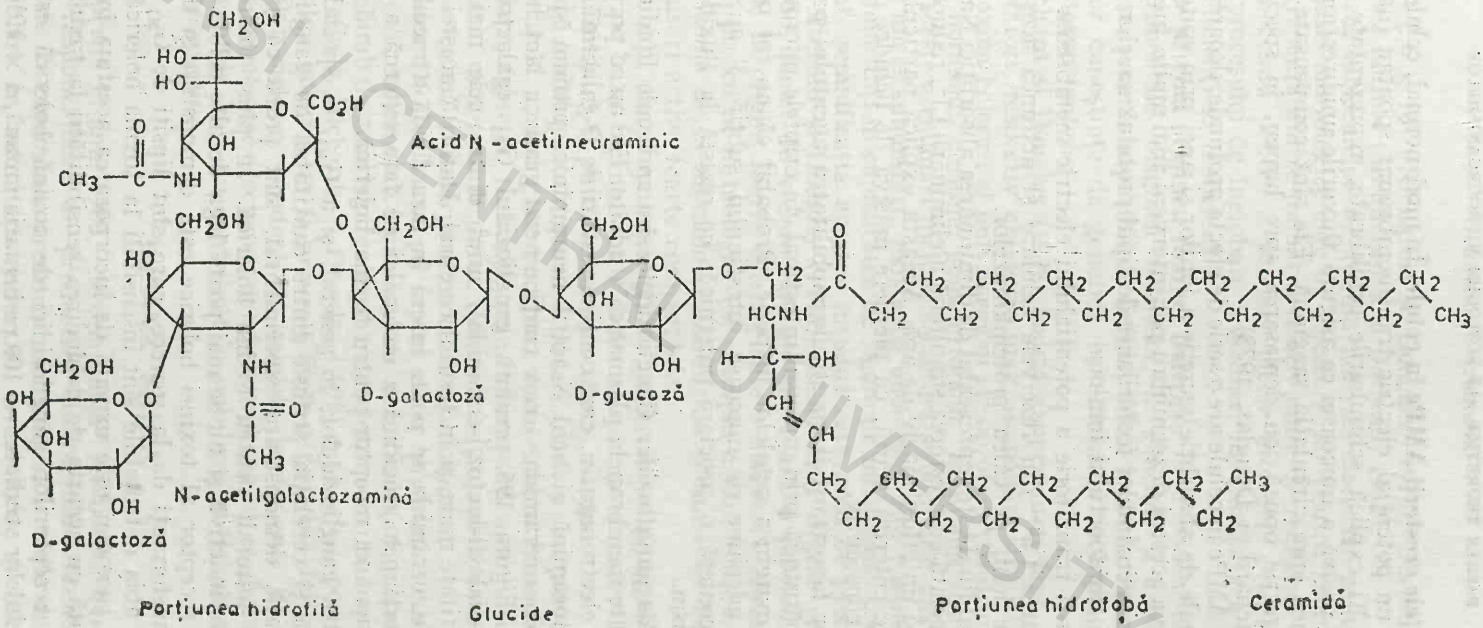



Fig. 195. — Structura gangliozidului $G_{M1}$ (după van Heyningen, 1977).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

**Consecințele creșterii AMPc în celule.** În mod normal, celulele mucoasei intestinale au un potențial electric transmembranar spontan (natural) cu o valoare mică. El explică schimburile echilibrate, reprezentate prin marea permeabilitate pasivă a mucoasei ce asigură fluxurile unidirecționale de $Na^+$ și $Cl^-$ din lumen spre circulația sanguină. Ele sînt compensate de un flux moderat în direcție opusă, cu deplasarea spre lumen, în special a ionilor bicarbonat (Richard și Douglas, 1978).

Creșterea AMPc în celule are o serie de efecte profunde, deoarece perturbă procesele normale de absorbție/secreție a ionilor și apei prin epiteliul intestinal. În realizarea acestui dezechilibru pot interveni mai multe mecanisme ca:

1) activarea enzimelor fosforilante de tipul proteinkinazelor, cu acțiune directă asupra transportului ionilor;

2) creșterea tranzitorie a potențialului electric membranar;

3) eliberarea $Ca^{2+}$ din rezervele celulare și acțiunea acestora asupra purtătorilor de ioni, pe calea proteinkinazelor.

Rezultatul final este reprezentat de diminuarea absorbției $Na^+$ în celulele microvililor asociată cu creșterea simultană a eliminării $Cl^-$, reducerea absorbției Na și Cl, și un eflux masiv de apă. Aceasta explică particularitatea clinică majoră de enterită acută, cu pierdere masivă de lichide, deshidratare gravă și șoc consecutiv.

Un factor favorizant îl constituie mobilitatea agentului patogen, care îi permite să pătrundă prin mucusul intestinal, în criptele microvilozităților, să se lege de marginea celulelor în perie. Probabil că un rol important în fenomenul de adeziune de mucoasa intestinului subțire îl au fimbriile și flagelii, care conferă o asociere puternică, ce rezistă la fluxul de materii și la peristaltism.

**Legarea de gangliozide.** Gangliozidele sînt molecule lipidice complexe prezente în toate membranele plasmatice studiate. Ele au o porțiune hidrofilă, încărcată electronegativ, care conține resturi de D-galactoză, D-glucoză, N-acetil galactozamină și acid N-acetil neuraminic, precum și o porțiune lungă hidrofobă — ceramida — care conține acizi grași cu lanț lung asociați cu sfingozina. Figura 195 prezintă gangliozidul $G_{M1}$ (galactozil-N-acetil-galactozaminil-sialozil-lactozil-ceramidă), unul dintre cele mai cunoscute, prezent în cantitate mare și în țesutul cerebral. Datorită acestei particularități structurale, ceramida se poate insera în faza fluidă a membranei celulare, lăsînd porțiunea glucidică a moleculei pe fața externă a membranei, pentru a reacționa ca receptor pentru toxina holerică.

Capacitatea gangliozidelor, în general, și a $G_{M1}$, în special, de a lega toxina holerică și corelația strînsă dintre cantitatea de gangliozide și cea de toxină legată, demonstrate experimental, sînt proba că gangliozidele sînt receptorii naturali pentru toxina holerică. În plus, toxina legată de gangliozide este inactivă și nu se mai poate lega de alte celule. Rolul gangliozidelor de receptor al toxinei holerice este demonstrat și de faptul că fibroblaștii transformați de la șoarece, care sînt lipsiți de $G_{M1}$ sau posedă doar cantități abia detectabile sînt insensibili la toxina holerică. Incubarea lor cu [$^3$H $G_{M1}$] exogen este urmată de încorporarea acestuia în membrana celulară și odată cu aceasta de dobîndirea sensibilității la toxină.

Numărul receptorilor gangliozidici de toxină holerică este variabil, după natura celulelor studiate: $\sim$ 100 pe hematia umană, $4 \times 10^4$ pe limfocit,

$1{,}5 \times 10^4 - 2{,}6 \times 10^6$ (Richards și Douglas, 1978), respectiv $5 \times 10^5 - 10^6$ /fibroblast normal (Middlebrook și Dorland, 1984).

Numărul moleculelor de toxină holerică necesare pentru producerea unor modificări morfologice este de 10/celulă, iar pentru efectul toxic $\sim$ 50/celulă. Discrepanța dintre numărul relativ mare de receptori și concentrația de toxină necesară pentru a produce efecte biologice evidente reflectă fie ineficiența procesului de înglobare a toxinei, fie existența a două tipuri de receptori (eficienți și ineficienți).

**Ipoteze privind originea toxinei holerice.** Este evident că în lipsa unor probe experimentale, originea toxinelor, în general, și a toxinei holerice, în special, este practic imposibil de definit. Unele fapte de observație și extrapolarea unor cunoștințe de genetică bacteriană și evoluționism au permis emiterea cîtorva ipoteze:

1) Richard și Douglas (1978) insistă asupra unui fapt sesizat de mai mulți cercetători, respectiv existența unor asemănări structurale și funcționale între toxina holerică și unii hormoni glicoproteici (tirotropina, hormonul luteinizant, hormonul corionic gonadotropinic, hormonul stimulator al foliculinelor). Aceste asemănări includ: structura subunitară, analogiile structurale dintre unele subunități, existența unor secvențe parțial sau complet identice, similarități în capacitatea de legare de membrane și de gangliozide etc. Evident, semnificația acestor înrudiri este greu de precizat.

După Richard și Douglas (1978), asemănările dintre proteine atît de neînrudite din punct de vedere biologic sugerează o posibilă evoluție convergentă, de la origini foarte diferite spre o structură eficientă, fapt care nu este fără precedent în biologie. Un exemplu caracteristic este reprezentat de chemotripsina de la animale și subtilizina produsă de *Bacillus subtilis*, care au situsuri active foarte comparabile.

În schimb, van Heyningen (1977) sugerează, mai degrabă, o evoluție divergentă, pe baza faptului că *Vibrio cholerae* și mamiferele care posedă hormonii amintiți ar fi putut avea un strămoș comun.

2) După o altă ipoteză, gena *tox* de la *V. cholerae* ar proveni din încorporarea accidentală a unei gene eucariote (pentru unii hormoni) în genomul bacterian, fapt, teoretic, realizabil prin intermediul unui virus. Un avantaj selectiv relativ minor ar fi putut determina „supraviețuirea" acestei gene în celula bacteriană și încorporarea ei în cromosom.

3) Collier (1975), bazat pe faptul că o proteină toxică eliberată de *Escherichia coli* reacționează încrucișat cu toxina holerică, pledează pentru ipoteza unui schimb de gene legate de plasmide între cele două specii, în intestin.

4) În sfîrșit, Richards și Douglas (1978) nu exclud posibilitatea că, la origine, toxina holerică ar fi provenit dintr-o proteină inițial normală, de tipul adenilat ciclazei, produsă de celulele bacteriene. Ea ar fi suferit o mutație la o formă care afectează metabolismul gazdei, conferindu-i, eventual, anumite avantaje, care au contribuit la stabilirea ei definitivă în populația bacteriilor respective.

## TOXINA SHIGA

Descoperită în anul 1903, „toxina Shiga" elaborată de *Shigella dysenteriae* este răspunzătoare de producerea sindromului dizenteric (shigeloza umană). Este o exotoxină proteică prezentă în mediile de cultură și în lizatele celulare cu activități citotoxice, neurotoxice și enterotoxice.

**Arhitectura moleculară.** Citotoxina nativă este sintetizată, ca și toxina difterică, sub forma unei proenzime inactive, cu g.m. 65 kdal. Este formată din două segmente: A (g.m. 30,8 kdal), enzimatic activ, și un oligomer B, format din 6—7 subunități (g.m. 5 kdal).

*Subunitatea A* conține o regiune sensibilă la tripsină, la nivelul căreia poate fi clivată în două fragmente: $A_1$ și $A_2$. Activitatea biologică ar fi conferită, prin analogie cu toxina difterică, de fragmentul $A_1$, în timp ce *subunitatea B* ar folosi pentru legarea de celulele sensibile (fapt însă nedemonstrat).

În realitate, organizarea toxinei Shiga este încă necunoscută. După Keusch (1983), ea ar avea o structură funcțională tripartită: 1) fragmentul A activ; 2) fragmentul E, corespunzător unei secvențe de tranzit transmembranar și 3) fragmentul B, component de legare de receptori.

Receptorii toxinei Shiga sînt molecule de glicoproteine, care poartă o scurtă catenă terminală N-acetil-D-glucozamină, legată în poziție β-1,4. Celulele HeLa, care au $\sim 10^6$ receptori, au o mare afinitate și capacitate de legare. Foarte multe celule sînt rezistente fie datorită lipsei de receptori, fie incapacității de a îngloba toxina în celulă.

**Pătrunderea toxinei în celulă** se realizează în cea mai mare parte prin endocitoză mediată de receptori și extrem de puțin prin pinocitoză. Mecanismul asigură o concentrare a toxinei în celule de 50—100 molecule/celulă (50% doze letale). Translocația în celulă este urmată de interacțiunea cu lizosomii.

Acțiunea fragmentului activ ar fi de tip enzimatic și s-ar manifesta (după o perioadă de latență de 3 ore) prin inactivarea subunității 60S a ribosomilor din celula eucariotă și odată cu aceasta prin blocarea sintezei proteinelor.

După Olsnes și colab. (1990), mecanismul molecular intim (comun și altor toxine ca *abrina, modeccina, volkensina, viscumina* etc.) ar consta în îndepărtarea unei singure molecule de adenină dintr-un rest de adenozină, localizată într-o regiune foarte conservată, aproape de extremitatea 3′ a ARN 28S. În felul acesta, ribosomii nu mai pot lega factorii ce asigură creșterea catenei polipeptidice („Elongation factors"). Mecanismul a fost demonstrat cu ajutorul activității enzimatice a ricinei A și confirmat și pentru toxina Shiga (fig. 196).

Deci, spre deosebire de enterotoxinele clasice, „toxina Shiga" nu activează adenozin ciclaza, ci inhibă sinteza proteinelor, blocînd creșterea catenelor polipeptidice.

**Rolul „toxinei Shiga"** în patogenia dizenteriei umane este, după Ketyi, discutabil și dubios.

*Shigella dysenteriae* se multiplică *in vivo* sub formă de microcolonii, produce local toxină, se multiplică în celulele individuale ale epiteliului colonului, determină leziuni extensive și produce simptomele caracteristice (colită, diaree etc.), provocînd moartea celulelor epiteliale, fenomene inflamatorii, ulcerații și pierderi masive de lichide. Termenul de neurotoxină ar fi greșit deoarece ea atacă inițial endoteliul vaselor sanguine, iar leziunile neurologice sînt secundare acestui efect. După Bridgewater și colab. (1955), ea este mai degrabă o „toxină vasculară".

Sensibilitatea diferitelor specii animale este foarte variată: doza letală pentru șoarece este de 700 de ori mai mare decît cea pentru iepure, în timp ce cobaiul este practic rezistent. Caracterul de enterotoxină, uneori cu efecte foarte grave, a fost descris și în cazul altor microorganisme, dintre care unele *(Bacillus cereus)* au fost considerate ca saprofite banale (tabelul nr. 33).

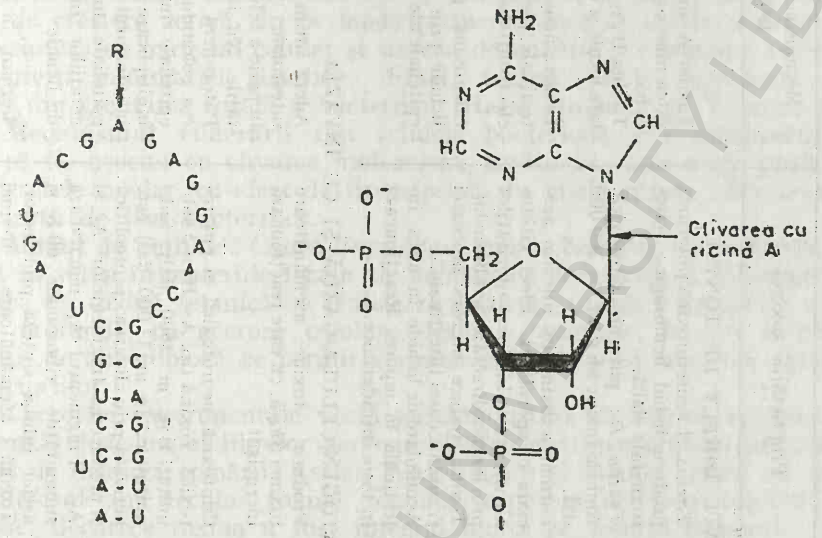



Fig. 196. — Activitatea enzimatică a catenei A a ricinei. Ea funcționează ca o N-glicozidază specifică ce clivează adenina din structura unui rest de adenozină unic, localizat în regiunea foarte conservată a ARN 28 S, aproape de extremitatea 3', „Scheletul" moleculei de ARN rămîne intact (după Olsnes și colab., 1990).

## TOXINA TETANICĂ

**Arhitectura moleculară.** Este sintetizată ca o proteină unică, cu g.m. 150 kdal, alcătuită dintr-o catenă grea (100 kdal) notată „A" și una ușoară „B" (50 kdal), menținute printr-o punte disulfidică și prin interacțiuni necovalente (Eidels, 1983). Ca și în cazul toxinei holerice, toxina tetanică poate fi izolată din supernatantul culturilor, ca o proteină incizată („nicked"), datorită secționării ei la nivelul unei legături peptidice, cu menținerea asociată a celor două fragmente, prin legătura —S—S—.

Separat, fiecare din cele două polipeptide A și B sînt netoxice (Matsuda și Yoneda, 1976).

După Middlebrook și Dorland (1984), în structura polipeptidului greu „A" există un al doilea situs sensibil la proteaze. Incizia la nivelul lui scindează catena „A" aproximativ în regiunea mediană.

În sfîrșit, în absența agenților reducători, molecula de toxină tetanică poate fi scindată în două noi catene:

1) Prima este formată din catena ușoară „B" integrală, legată de un al doilea fragment de 50 kdal, reprezentat de extremitatea aminoterminală a polipeptidului greu. Această catenă a fost denumită, din nefericire, tot „B", fapt care creează o mare confuzie. Izolată, această catenă (A + parțial B) este foarte toxică pentru animalele de laborator, spre deosebire de catenele A și B propriu-zise separate.

*Tabelu nr. 33*

**Enterotoxine care produc leziuni structurale ale celulelor epiteliale intestinale**
(după Arbuthnott, 1988)

| Bacteria și toxina | Boala și simptomele | Proprietățile toxinei | Mecanismele posibile ale patogenității |
|---|---|---|---|
| | | LEZIUNI DETERMINATE DIRECT DE TOXINE | |
| *Clostridium difficile*<br>Toxinele A și B<br>(Wilkins și colab., 1985) | Colită pseudomembranoasă; producerea de pseudomembrane pe mucoasa colonului și diaree severă | *Toxina A*: enterotoxină puternică produce lichid hemoragic; citotoxicitate slabă.<br>*Toxina B*: puternic citotoxică. Ambele toxine au g. m. > 300 000 dal. | Toxina A mărește permeabilitatea mucoasei colonului; exsudat lichid.<br>Toxina B produce distrugeri tisulare locale și hemoragii. |
| *Clostridium perfringens*<br>Enterotoxina tip A<br>(McDonel, 1986) | Intoxicație alimentară (S.U.A.) | Formarea toxinei în intestin asociată cu sporularea. Efect citotoxic asupra celulelor vilozităților prin lezarea directă a membranelor. | Lezarea membranelor celulelor intestinale, pierderea de lichid și electroliți ducînd la diaree. |
| *Bacillus cereus*<br>(Turnbull, 1986) | Intoxicație alimentară „tip diareic" | Toxina produce necroză mucoasei și submucoasei intestinale.<br>Acumulare de lichide în ansa intestinală la iepure. Reacționează în teste intradermice. | Citotoxină; produce pierdere de lichide prin distrugerea celulelor epiteliale ale vilozităților. |
| | | LEZIUNI ASOCIATE CU CONTACTUL PATOGEN/CELULA-GAZDĂ ȘI CU INVAZIA | |
| *Escherichia coli*<br>Enteropatogen (ECEP)<br>(Levin, 1984) | Diaree la copii | Produce toxine asemănătoare toxinei *Shiga*, cu care reacționează încrucișat | Aderă intim de celulele epiteliale intestinale; distrug. marginea în perie a celulelor și microvilozitățile. Nu invadează. |
| *Shigella* sp.<br>(Formal și Levine, 1984) | Shigeloză umană cu diaree sanguinolentă | Citotoxică, neurotoxică și enterotoxică. Toxină tip. A—B cu 5 subunități B (g. m. 3800. dal). Subunitatea A (g. m. 31 000. dal) este activată prin clivarea proteolitică și producerea fragmentelor $A_1$ și $A_2$. Fragmentul $A_1$ inactivează subunitățile ribosomale 60 S și astfel inhibă sinteza proteinelor. | Patogeneză complexă: colonizarea colonului, legarea de celulele epiteliale intestinale, pătrundere, multiplicare și elaborare de toxine în interiorul lor. Moartea celulelor epiteliale amorsează formarea ulcerațiilor, inflamația și pierderea de lichide |
| *Escherichia coli*<br>Enteroinvazivă (ECEI)<br>(Levine, 1984) | Diaree umană | Toxină asemănătoare toxinei Shiga. | Leziuni, în esență, asemănătoare celor produse de *Shigella* sp. |

2) A doua catenă izolată în aceste condiții, denumită *fragmentul „C"*, are 50 kdal, este reprezentată de restul catenei grele și este netoxică.

Din aceste date rezultă că toxina tetanică este sintetizată ca o pretoxină, care este transformată în toxină biologic activă prin incizia polipeptidului la situsuri fixe, sub acțiunea proteazelor bacteriene.

Sinteza toxinei tetanice are loc, în cea mai mare parte, după sfîrșitul fazei de creștere activă. În perioada premergătoare ar exista o competiție între sinteza de material celular și sinteza de enzime și exotoxine la nivelul transcrierii informației genetice. Final, toxina poate reprezenta pînă la 10% din greutatea totală a bacteriilor (Hara, Mutsuda și Yoneda, 1971).

**Mecanismul eliberării** din celulele bacteriene este necunoscut, dar pare să fie asociat cu clivarea moleculelor toxice de către unele proteinaze din peretele celular, cu efect de tip tripsină. În unele cazuri, eliberarea este favorizată de liza bacteriilor.

**Modul de acțiune.** *Clostridium tetani* este o bacterie neinvadantă, prezentă în sol și în materiile fecale ale animalelor domestice și sălbatice. Producerea de toxină tetanică se realizează în urma infecției localizate a unor plăgi profunde, cu necroze celulare, leziuni vasculare, în care se creează condiții de anaerobioză ce permit germinarea sporilor și creșterea extensivă a bacteriilor.

Cercetări experimentale vechi au demonstrat că toxina tetanică este transmisă de-a lungul fibrelor nervoase pentru a atinge organul-țintă reprezentat de măduva spinării. Astfel, Wassermann și Takaki (1898) au arătat că filtratul amestecului toxină tetanică/suspensie de țesut cerebral este netoxic, deoarece toxina a fost integral fixată pe țesutul cerebral.

Kryzhanovsky (1973), urmărind difuzia toxinei tetanice marcată, a propus următoarea schemă de transmitere: terminațiile nervoase din mușchi → trunchiul nervos → rădăcinile ventrale → fibrele rădăcinilor ventrale în măduva spinării → coarnele anterioare din segmentul spinal.

Habermann (1973), utilizînd toxina marcată cu $^{125}I$, a confirmat aceste date: cantitatea de radioactivitate este de cinci ori mai mare în substanța cenușie decît în cea albă. Marcajul este minim în coarnele dorsale și maxim ventrolateral, respectiv în regiunile cu neuroni motori.

Figura 197, după Bizzini (1977), prezintă schematic căile de circulație a toxinei tetanice pe baza datelor actuale. Injectată intramuscular, toxina se leagă de terminațiile nervilor periferici și este internalizată și transportată axonal retrograd.

Pentru a ajunge la situsul final de acțiune, toxina tetanică trebuie legată, internalizată și transportată în neuroni. Transportul pare să aibă loc în veziculele netede, în cisterne și în tubuli. După ce a pătruns intracelular se localizează în lizosomi.

Transportul are loc exclusiv pe calea fibrelor, fapt care explică acumularea ei în neuronii motori corespunzători, în timp ce axonii rămîn lipsiți de toxine. Transportul se realizează numai pe cale intraaxonală și nu prin spațiile intraneurale (respectiv prin țesutul extraaxonal). Urmărind circulația toxinei adsorbite pe particule de aur coloidal, Schwab și Thoenen (1976) au demonstrat că aceste complexe injectate la periferia organismului migrează trans-simpatic, prin transport axonal retrograd, și sînt găsite în motoneuronii măduvei spinale după 14—16 ore.

Lucrînd cu vezicule artificiale încărcate cu toxina tetanică, Boquet și Duflot (1982) au demonstrat că fragmentul B este singurul capabil să

determine formarea de „canale" prin care pătrunde în interiorul acestora. Nici fragmentul ușor și nici segmentul C nu au această proprietate.

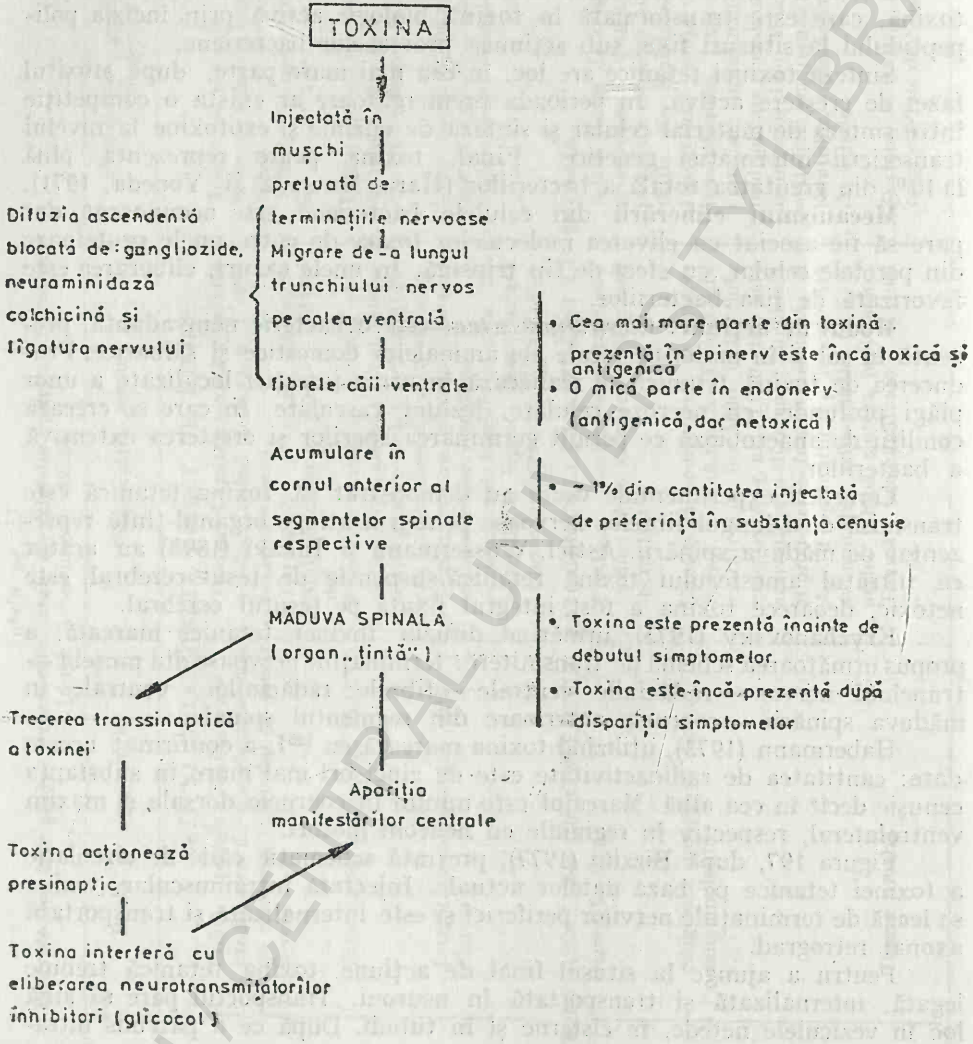



Fig. 197. — Reprezentarea diagramatică a modului de răspîndire și de acțiune a toxinei tetanice (după Bizzini, 1979).

*Receptorul de toxină tetanică* corespunde din punct de vedere structural receptorului pentru tirotropină „TSH" („Thyroid stimulating hormone"), prezent în număr mare pe suprafața celulelor tiroidiene. Această afirmație se bazează pe mai multe probe experimentale:

1) toxina tetanică marcată cu $^{125}I$ se leagă de celulele tiroidiene cu aceeași afinitate ca și tirotropina marcată în același mod;

2) legarea toxinei de receptorii TSH poate fi împiedicată prin preincubarea celulelor tiroidiene cu tirotropină și invers;

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

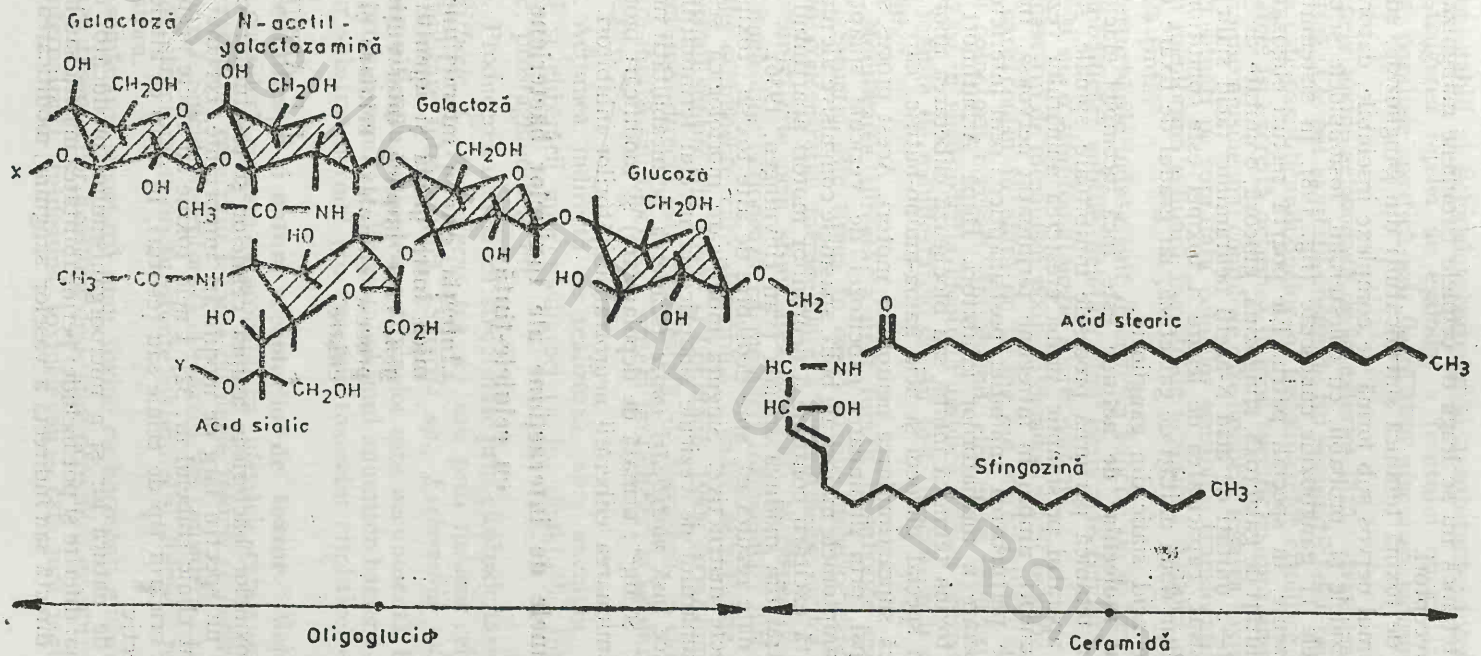



Fig. 198. — Modelul general de structură a gangliozidelor. În structura monogangliozidelor ($G_I$), x și y = H. În disialogangliozidul $G_{II}$: x = acid ialic, y = H. În disialogangliozidul $G_{III}$: y = acid sialic, x = H. În trisialogangliozidul $G_{IV}$: x și y sînt reprezentați de acidul sialic (după van Heyningen și Melanby, 1971).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3) toxina tetanică nu se leagă de celulele tiroidiene malignizate, care sînt lipsite de receptori.

Receptorii de toxină tetanică sînt alcătuiți din gangliozide, substanțe prezente în sistemul nervos sub formă de complexe insolubile, datorită asocierii cu cerebrozidele și, probabil, cu colesterolul, fosfolipidele și cu unele proteine. Din cele 11 gangliozide cunoscute (fig. 198), în sistemul nervos central sînt prezente, în special, patru. Ele poartă resturi oligozaharidice ce conțin două unități de galactoză, sfingozină, glucoză, o unitate de N-acetil glucozamină și 1—3 unități de acid N-acetil neuraminic (acid sialic). După cum s-a demonstrat, capacitatea de legare a toxinei este condiționată de prezența a cel puțin două unități de galactoză, iar gradul de fixare depinde de cantitatea de acid sialic din gangliozid.

**Mecanismul molecular de acțiune** este încă incomplet elucidat. Se admite că toxina tetanică perturbă procesele inhibitoare spinale. Acțiunea s-ar exercita pe aparatul presinaptic, probă creșterea numărului veziculelor sinaptice, care, uneori, umplu în întregime terminația nervoasă. În consecință se produce perturbarea inhibiției postsinaptice, prin interferența cu procesul de eliberare a mediatorilor inhibitori. După Arbuthnott (1988), în mod specific, toxina tetanică inhibă sau blochează eliberarea unor neurotransmițători, în special glicocol și acid gama-amino-butiric, care, în mod normal, împiedică suprastimularea neuronilor motori. Acest proces se realizează, în principal, prin diminuarea exocitozei de vezicule sinaptice. În consecință apar simptomele majore ale bolii, spasmele convulsive ale mușchilor voluntari, datorită excitării continue a neuronilor motori aparținînd aparatului reflex central din măduva spinală (van Heyningen, 1986).

Din aceste date rezultă că, spre deosebire de alte toxine, toxina tetanică nu are efecte distructive. Singura modificare morfologică sesizabilă este creșterea numărului de vezicule sinaptice la nivelul terminațiilor nervoase. Ea produce însă *modificări ionice* (scăderea permeabilității membranelor pentru $Ca^{2+}$ și $Mg^{2+}$, urmată de depolarizare) și modificări biochimice decurgînd din diminuarea eliberării neurotransmițătorilor inhibitori.

## Mecanismele de interacțiune ale toxinelor bacteriene cu celulele-țintă

**„Infecția este o interacțiune dinamică între gazdă și agentul patogen, care implică intervenția unor procese complexe celulare și moleculare"**

J. P. Arbuthnott

Acțiunea toxinelor bacteriene asupra celulelor și țesuturilor organismelor determină un spectru larg de modificări importante, cel mai adesea exprimate evident clinic (tabelul nr. 32). Unele toxine au efecte nespecifice, acționînd asupra oricărui tip de celule sau țesuturi, în timp ce altele acționează foarte selectiv.

În funcție de natura lor și a microorganismului producător efectele sînt dintre cele mai diferite și pot include: permeabilitatea mărită sau hemoragii prin afectarea directă sau indirectă a vaselor sanguine, modificarea consti-

tuenților stabili ai lichidelor corpului și a substanței interstițiale a celulelor, distrugerea rețelei de esafodaj a țesutului muscular, liză și necroză celulară, paralizie spastică sau flască prin afectarea neuronilor sau sinapselor etc.).

Unele toxine acționează de la exterior fără a traversa membrana citoplasmatică. Ele pot exercita efecte de tip enzimatic, determinînd liza celulelor. Așa este cazul hemolizinelor, al fosfolipazelor citolitice în general.

Altele își exercită acțiunea în mod specific asupra unor ținte intracelulare, prin mecanisme mai complexe care implică: legarea toxinelor de receptori specifici situați pe suprafața celulelor sensibile, translocația (internalizarea) lor prin membrana celulară înainte de a acționa asupra unui organit- sau moleculă-țintă.

Perturbările induse sînt diferite în funcție de natura țintei și variază de la modificări subtile neletale pînă la moarte celulară, însoțită sau nu de liză și cu o simptomatologie foarte variată.

Acest tip de mecanism poate fi demonstrat și *in vitro* în sisteme purificate, care conțin în afară de toxina sau derivații săi activi, substratul-țintă și cofactorii necesari. În general, efectul *in vitro* este rapid și direct, în timp ce *in vivo* apariția efectului implică adesea prezența unei perioade de lag înainte de manifestarea sa. Au fost descrise mai multe modalități de acțiune:

1. Modificarea directă a unor funcții metabolice esențiale a celulei-„țintă". Situația este tipică în cazul toxinei holerice care acționează prin creșterea concentrației intracelulare a nucleotidelor ciclice AMPc și GMPc, ce sînt sintetizate prin stimularea adenilat- și respectiv guanilat ciclazei. Aceste nucleotide acționează ca mesageri intracelulari într-o secvență complexă de evenimente care determină o mare secreție de apă și electroliți în intestinul subțire (de Jonge și Lohmann, 1985; Arbuthnott, 1988).

Acțiunea directă este manifestată, de asemenea, în cazul toxinei difterice, care inhibă sau blochează sinteza proteinelor, acționînd asupra factorului EF-2.

2. Acțiunea indirectă se realizează, spre exemplu, prin stimularea sintezei și eliberării unor mediatori ca interleukinele, interferonii, leukotrienele, prostaglandinele etc.

3. Producerea de leziuni structurale prin citotoxicitate directă *(Clostridium difficile, C. perfringens tip A)* sau prin invazia celulelor intestinale și multiplicare intracelulară *(Shigella sp., Escherichia coli* enteroinvaziv).

**Semnificația biologică** a toxinelor este necunoscută. Ele ar reprezenta simpli produși rezultați din metabolismul anumitor bacterii sau ar fi enzime al căror substrat normal (cu excepția toxinelor citolitice) este încă neidentificat.

**Semnificația și natura receptorilor de toxine.** Majoritatea cercetătorilor consideră că este improbabil ca diferitele celule de la mamifere să poarte receptori care prin legarea cu unele toxine ar determina propria lor distrugere („Suicide receptors"). De aceea, se consideră că probabil toxinele mimează structura unor substanțe naturale și folosesc receptorii normali ai acestora.

Asemănarea structurii unor toxine cu hormonii glicoproteici sugerează utilizarea receptorilor acestora deși, spre deosebire de hormoni, care nu trebuie internalizați, totdeauna toxinele au — cele mai multe — ținte intra-

celulare pe care trebuie să le atingă, fie ca molecule intacte, fie ca fragmente biologic active.

Argumente în favoarea acestei ipoteze: 1) Atît toxinele, cît și hormonii sînt alcătuiți din două componente, unul activ, celălalt de legare; 2) Există omologii evidente în secvența aminoacizilor în fragmentul activ și în cel de legare al toxinei holerice și cel al hormonilor glicoproteici (luteinizant, tirotropină etc.).

### Toxoizii

Exotoxinele își pot pierde spontan toxicitatea, fără a-și pierde antigenitatea (capacitatea de a stimula producerea de anticorpi, care se combină atît cu proteinele toxice, neutralizîndu-le, cît și cu cele atoxice). Ehrlich a numit produsul astfel obținut *toxoid*, iar Ramon, *anatoxină*. Deși sînt mai stabili decît toxina activă, toxoizii își pierd treptat, cu timpul, atît capacitatea de a stimula anticorpogeneza, cît și capacitatea de combinare cu anticorpii. Transformarea toxinelor la toxoid poate fi efectuată de o serie de substanțe ca acidul nitros, acidul ascorbic, hexametilentetramina etc.

Efectul toxoidizant al formaldehidei a fost descoperit de Lowenstein (1905) și redescoperit de Glenny și Sudmersen (1921) și Ramon (1923). Acțiunea formaldehidei 0,2—0,4% la pH 6,0—9,0 este practic imediată și poate fi evidențiată prin diminuarea toxicității chiar după un minut de la adăugare. Procesul de detoxifiere evoluează în două etape: în prima etapă (7—24 de ore), toxicitatea scade exponențial pînă la o valoare redusă, iar în cea de-a doua, lentă, de ~ 5 zile, inactivarea dependentă de pH (mai lentă la pH scăzut; la pH 8,0—9,0 ~ 90% din toxină este complet inactivată în cîteva zile) duce la pierderea totală a toxicității. Pentru rațiuni de securitate, durata perioadei de tratare cu formaldehidă este prelungită la 4 săptămîni, deși, după van Heyningen (1970), ea reduce inițial capacitatea de anticorpogeneză și apoi și pe cea de combinare cu anticorpii.

Detoxifierea este însoțită de modificări minime ale structurii moleculare a toxinei, respectiv de modificări selective ale regiunii implicate în toxigenitate, cu menținerea structurii globulare, a grupărilor răspunzătoare de reactivitate imunologică și de capacitatea de fixare pe receptorii celulari. Detoxifierea se face prin producerea de punți metilenice ($-CH_2-$), intramoleculare (între resturile de aminoacizi situați pe aceeași moleculă) sau intermoleculare (situați pe molecule diferite).

Frecvent, formaldehida acționează pe mai multe căi: 1) legînd grupările $-NH_2$ ale resturilor de lizină cu o grupare în poziția orto a nucleului fenolic al tirozinei, cu formarea unei punți metilenice („compusul X"); 2) prin legarea a două resturi de lizină de un rest de tirozină („compusul Y") sau 3) prin unirea a două resturi de lizină prin grupările lor $-NH_2$ („compusul Z") (Blass, Bizzini și Raynaud, 1967; Bizzini, Turpin și Raynaud, 1974).

Toxoidul conține astfel unii compuși chimici noi ca: (3'—$CH_2$—Tyr——Lys); (N—Lys)$_2$—(3', 5'—$CH_2$—Tyr), (N—Lys)$_2$=$CH_2$, (Lys—$CH_2$—Tyr——$CH_2$—Lys), rezultați din legarea prin punți metilenice a aminoacizilor amintiți și, mai rar, și a histidinei și argininei (Bizzini, 1984). Se realizează astfel modificarea unor aminoacizi localizați în regiunea „toxică" a moleculei și, uneori, o adevărată „închidere" sau „astupare" a ei sub efectul punților metilenice.

Cel puțin în unele cazuri, detoxifierea pare să fie consecința formării de legături metilenice intramoleculare, deoarece Bizzini (1984) a izolat un toxoid tetanic monomeric cu putere mai mare decît cel polimeric. De menționat, că formarea de legături metilenice poate determina încorporarea în toxoid a unor substanțe proteice sau nucleoproteice nedorite, prezente în preparatul brut sau parțial purificat. Ele pot explica apariția reacțiilor neplăcute postvaccinale. De aceea, se recomandă ca detoxifierea la toxoid să se facă pornind de la toxinele purificate.

## TOXINELE INTRACELULARE
## ENDOTOXINELE BACTERIENE

**„Endotoxinele au un farmec propriu de-a dreptul fabulos. Ele par să fie hărăzite de Natură cu virtuți și vicii în proporții riguros exacte și fascinante pentru a le face irezistibile pentru orice cercetător care începe să le cunoască..."**

I. L. BENNETT

Endotoxinele sînt substanțe toxice legate ferm de peretele celular al bacteriilor Gram-negative, sub forma unui complex macromolecular compus din lipide, polizaharide și proteine. Sînt, în general, eliberate din mediu numai după dezintegrarea bacteriilor sau după liza lor.

Extrase inițial de Centanni (1883), care le-a numit *pirotoxine* (datorită proprietăților lor piretogene), au fost denumite ulterior: antigene Boivin, pirogeni, lipopolizaharide bacteriene sau, mai recent, complexe endotoxice.

Sînt produse de o mare varietate de bacterii, predominant *Enterobacteriaceae*, patogene și nepatogene pentru om și animale, între care *Salmonella*, *Escherichiae*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pasteurella*. Figurile 199 și 200 prezintă structura endotoxinelor de la *Salmonella* și *Escherichia coli*, precum și raporturile lor cu constituenții pereților celulari și, în mod particular, cu membrana externă din care fac parte.

Endotoxina a fost izolată inițial prin extracție cu acid tricloracetic, de Boivin și Mesrobeanu (1935). Ei au demonstrat că este un complex glucido-lipido-polipeptidic, cu g.m. mare, care induce la animale simptome (febră, leucocitoză, alterări hemodinamice și, în doze mari, șoc endotoxic și moarte), asemănătoare infecțiilor naturale.

Lüderitz și Westphal (1952) au realizat extracția cu amestecul fenol/apă la cald (65—68°C). Complexul endotoxic a fost izolat din soluția apoasă, după răcire, sub forma unui complex lipopolizaharidic macromolecular (lipsit de proteine și acizi nucleici). S-a demonstrat că proporția de lipide și polizaharide variază de la o specie la alta și chiar la tulpinile aceleiași specii.

Shands, Graham și Nath (1967) au demonstrat că lipopolizaharidul derivat din tulpinile „S" de *Salmonella typhimurium* după extracție prin tehnica fenol/apă și colorate cu acetat de uranil apare la microscopul electronic sub forma unor panglici, avînd lățimea de 160 Å și Ø90 Å, cu struc-

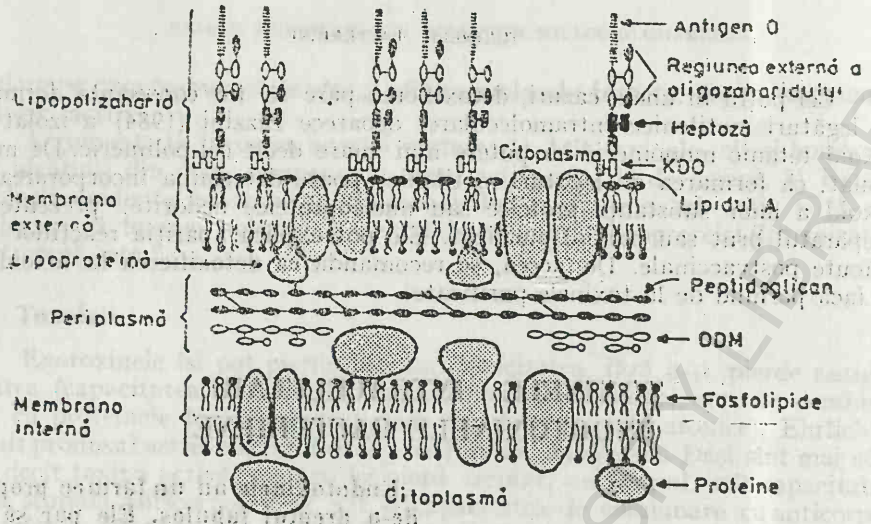



Fig. 199. — Reprezentarea schematică a structurii moleculare a învelișului bacteriei *Escherichia coli*. Ovalele și dreptunghiurile reprezintă resturi glucidice, iar cercurile, grupările polare ale fosfolipidelor: ODM = oligozaharide derivate din membrană; KDO = acid 3-deoxi-D-mano-octulosonic; KDO + heptoza formează regiunea internă proximală a oligozaharidului (după Raetz, 1990).

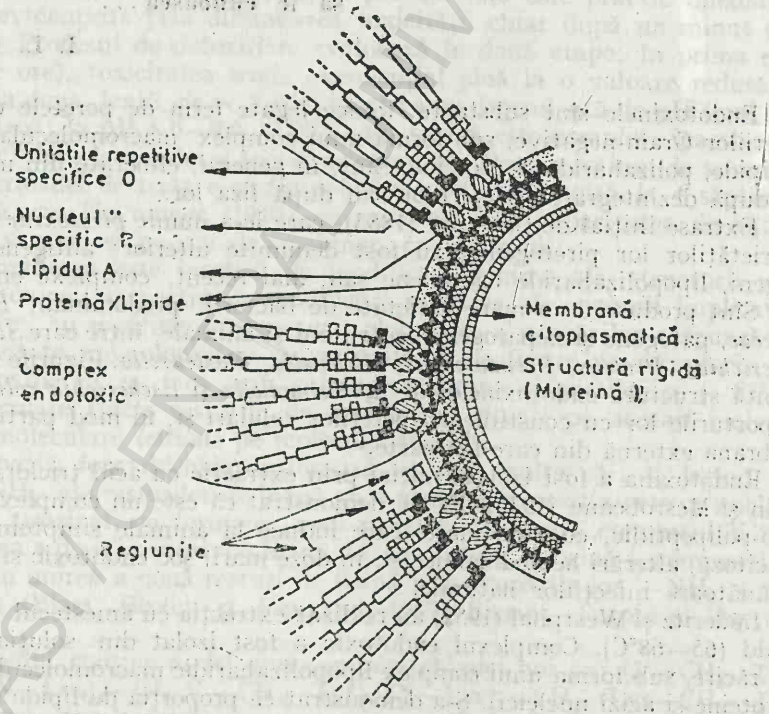



Fig. 200. — Reprezentarea schematică a peretelui celular de la *Salmonella* sp., prezentînd structura detaliată a lipopolizaharidului. Regiunea I: regiunea unităților repetitive specifice O. Regiunea II: „nucleul" oligozaharidic specific R. Regiunea III: lipidul A. Numărul catenelor lipopolizaharidice în complexul endotoxic este reprezentat numai schematic (după Westphal, 1974).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tură trilaminară: două straturi fine, dense, electronopace, delimitează o regiune centrală clară.

## STRUCTURA LIPOPOLIZAHARIDELOR

Cele mai multe date se referă la lipopolizaharidele (LPS) izolate din *Enterobacteriaceae* în structura cărora au fost descrise trei regiuni distincte chimic, biologic și genetic: 1) *catena specifică laterală „O"*; 2) *regiunea centrală* („Core") *oligozaharidică* și 3) *lipidul A* (fig. 201, 202).

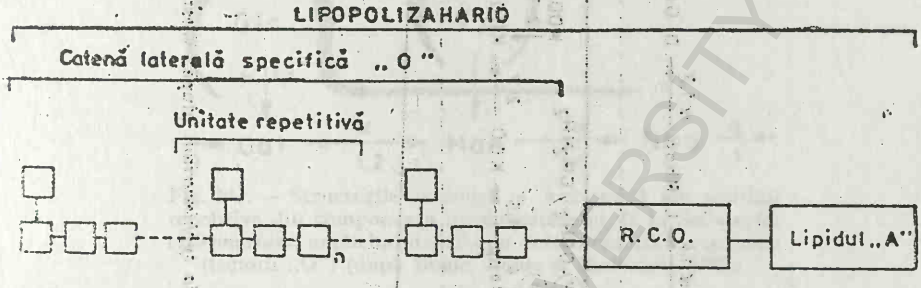



Fig. 201. — Modelul general de structură a lipopolizaharidelor de la *Enterobacteriaceae*: R.C.O. = regiunea centrală oligozaharidică („core") (după Brade, Brade și Rietschel, 1988).

**Catena specifică** O este un heteropolizaharid, care poartă determinanții antigenici de specie, răspunzători pentru specificitatea anticorpilor produși în cursul imunizării omului și animalelor cu bacterii vii sau omorîte sau cu extracte polizaharidice (Westphal, 1997).

Antigenul polizaharidic somatic este numit *antigenul O* și poartă în structura sa mai mulți *determinanți antigenici O* sau *factori O*. Pe baza lor, Kauffmann (1957) a întocmit o schemă de clasificare serologică a genului *Salmonella*.

Studiul structurii chimice a polizaharidelor O de la *Enterobacteriaceae* a confirmat ipoteza lui Staub (1959, 1966) și Robbins (1962), care au sugerat existența unor unități oligozaharidice repetitive, compuse din mai multe resturi monozaharidice. Fiecare unitate repetitivă poate să conțină mai mulți determinanți (factori) O, care, împreună, determină serotipul speciei bacteriene date.

Figura 203 prezintă structura repetitivă trizaharidică de la *S. typhi*, compusă din D-galactoză (Gal), D-manoză (Man) și L-ramnoză (Rha). De molecula de galactoză este legată, sub forma unei catene laterale, o moleculă de D-glucoză (Glc), iar de manoză este legată D-tiveloza (Tyv) (3,6—didezoxi-D-manoza). Restul de glucoză legat α-1,4, împreună cu scheletul trizaharidic, determină *factorul de specificitate 12*, iar tiveloza determină *factorul de specificitate 9*, caracteristic pentru grupul $D_1$ de *Salmonella*, Deci, formula serologică completă a *S. typhi* este grupul $D_1$ *Salmonella* [9, 12].

La alte enterobacterii, natura grupărilor imunodominante ale polizaharidelor este diferită: 1) abecvoza (3,6-didezoxi-D-glucoza) la *S. typhimurium;* 2) paratoza (3,6-didezoxi-D-galactoza) la *S. paratyphi;* 3) colitoza (3,6-didezoxi-L-galactoza) la *Salmonella grup P* și *E. coli 111*.

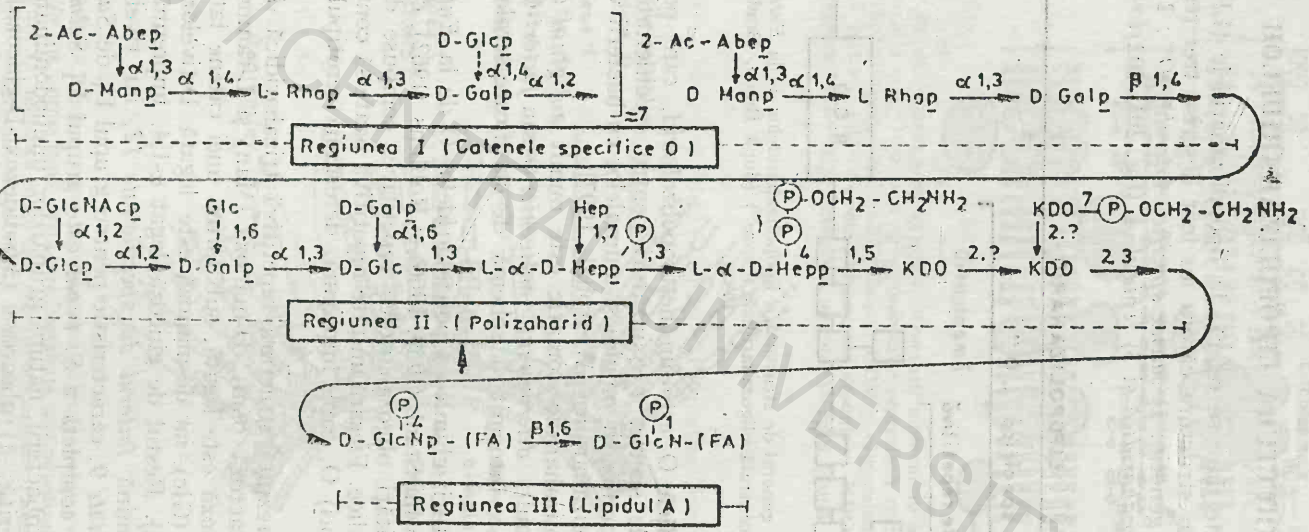



Fig. 202. — Structura catenei lipopolizaharidice de la *Salmonella typhimurium* (după Westphal, 1974).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Specificitatea polizaharidelor O rezidă în natura oligozaharidelor, în modul lor de legare etc. Modificări minime ca, de exemplu, acetilarea sau deacetilarea glucozei, datorită prezenței sau deficitului unei enzime bacteriene specifice poate determina apariția sau dispariția unui factor serologic specific. Din aceasta decurge o mare diversitate structurală și antigenică a catenei specifice O.

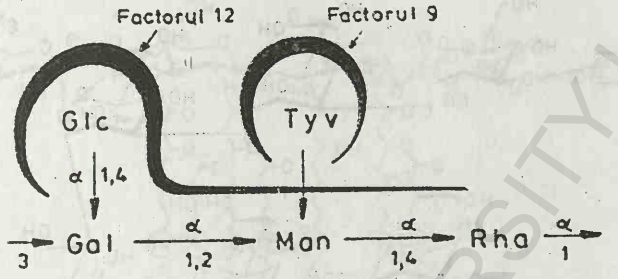



Fig. 203. — Structurile chimică și antigenică ale unității repetitive din componenta lipopolizaridului de la *Salmonella typhimurium*, explicînd distribuția determinanților antigenici (factorii „O") (după Brade, Brade și Rietschel, 1988).

**Regiunea oligozaharidică centrală** („Core Region") este, după Brade, Brade și Rietschel (1988), un heterooligozaharid care poate fi subdivizat, în raport cu lipidul A, într-o regiune internă proximală („Lipid A — proximal Inner Core") și o regiune distală externă („Lipid A—distal Outer Core"). Ele diferă din punctul de vedere al arhitecturii moleculare. Regiunea internă (proximală) este formată din două glucide neobișnuite și anume din heptoză, în principal în configurația L-glicero-D-mano sau D-glicero-D-mano și de KDO.

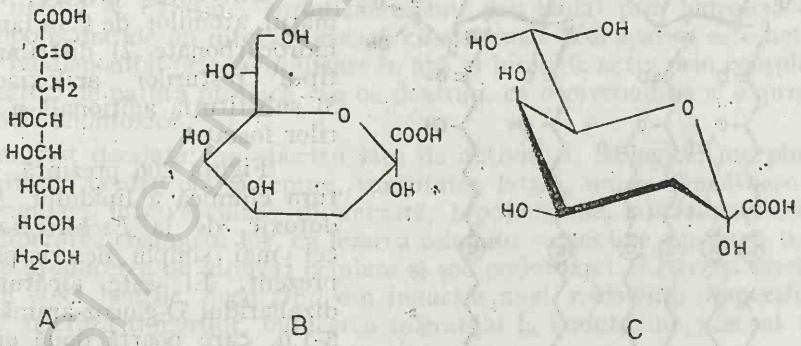



Fig. 204.—Formula chimică a acidului 3-deoxi-D-mano-octulosonic (2-keto-3-deoxi-D-mano-octulosonic sau KDO). **A.** Forma aciclică. **B.** Forma cetopiranozică **C.** Reprezentarea conformațională a formei cetopiranozice (după Brade, Brade și Rietschel, 1988).

Figura 204 prezintă formulele chimice ale KDO (acidul 2-keto-3-deoxi-D-mano-octonic) sau acidul 3-deoxi-D-mano-octulosonic, care este un glucid acid-polifuncțional, ce poartă simultan grupări carboxil, ceto-, dezoxi- și hidroxil. Regiunea distală este alcătuită din glucide prezente obișnuit, ca, de exemplu, D-glucoza, D-galactoza și N-acetil-D-glucozamină.

Variabilitatea structurală a regiunii oligozaharidice centrale este foarte limitată comparativ cu cea a catenei specifice O. Astfel, toate speciile de *Salmonella* (fig. 205) au un singur tip comun (tipul „Ra-core"), în timp ce *E. coli* are 6 tipuri pentru cele toate cîteva sute de serotipuri diferite (Brade, Brade și Rietschel, 1988).

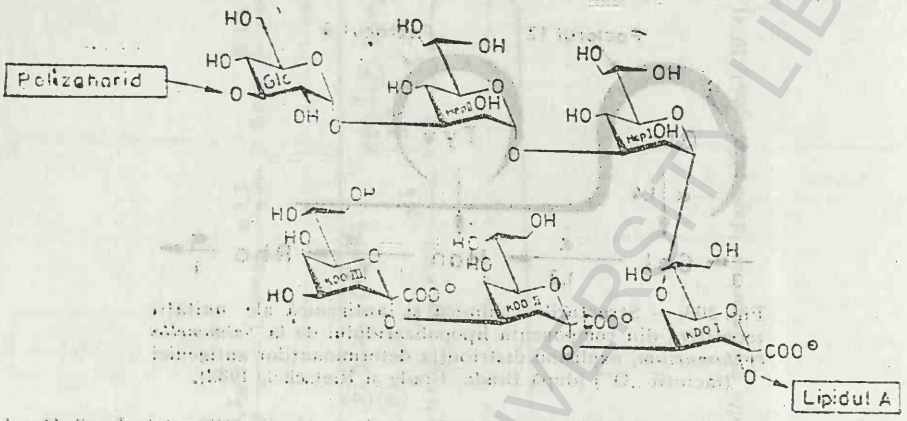



Fig. 205. — Structura chimică a porțiunii oligozaharidice a lipopolizaharidului de la *Salmonella minnesota* tulpina $R_5$ (după Brade, Brade și Rietschel, 1988).

**Lipidul A** este partea cea mai conservată a lipopolizaharidului. Structura sa de bază formată dintr-un „schelet" hidrofil și patru moli de acizi grași 3-hidroxi, cuprinzînd cel puțin două resturi aciloxiacil, este prezentă în toate lipopolizaharidele cu activități endotoxice.

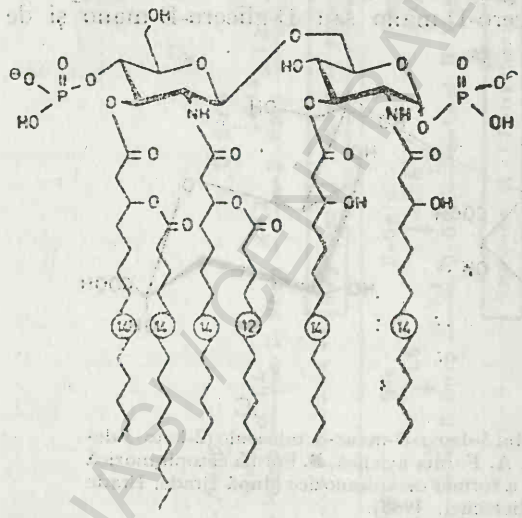


Fig. 206. — Structura chimică a lipidului A tip *Escherichia coli*. Cifrele din interiorul cercurilor indică numărul atomilor de carbon din lanțurile acil (după Brade, Brade și Rietschel, 1988).

Diferențele privesc: 1) numărul atomilor de C în lanțurile hidrocarbonate; 2) distribuția și tipul resturilor aciloxiacil și 3) substituția adițională a resturilor fosfat.

Figura 206 prezintă structura chimică a lipidului A endotoxic de la *Escherichia coli*, cel mai simplu descris pînă în prezent. El este alcătuit din dizaharidul D-glucoz-amină legat β-1,6, care poartă două grupări fosforil: un fosfat legat α-glicozidic în poziția 1 a extremității reducătoare și un fosfat legat esteric în poziția 4 a extremității nereducătoare.

Dizaharidul glucozaminăbifosforilată, numit „scheletul" hidrofil al lipidului A, este substituit în pozițiile 2,2′ 3 și 3′ cu 4 moli echivalenți de acid (R)-3-hidroximiristic, în legături amidă și ester.

Grupările hidroxil aparținînd resturilor acil ale glucozaminei nereducătoare sînt esterificate în pozițiile 2 și 3 cu acid lauric și respectiv miristic. Resturile aciloxiacil sînt markeri structurali tipici ai lipopolizaharidelor și par să fie asociate cu anumite activități biologice (Brade, Brade și Rietschel, 1988).

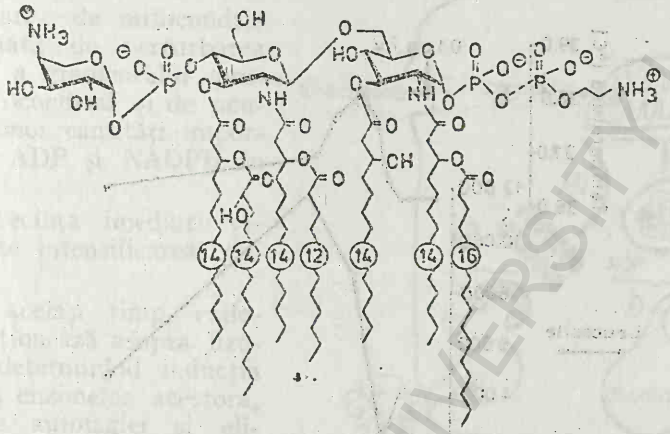


Fig. 207. — Structura chimică a lipidului A tip *Salmonella*. Numerele din interiorul cercurilor indică numărul atomilor de carbon din lanțurile acil (după Brade, Brade și Rietschel, 1988).

Figura 207 prezintă structura lipidului A, mai complex, izolat de la *Salmonella*. El este alcătuit din aceleași elemente ca la *Escherichia coli*, dar prezintă substituenți adiționali.

*Activitatea biologică a lipidului A*. După Brade, Brade și Rietschel (1988), lipidul A, ca atare, sintetizat chimic sau izolat prin hidroliză acidă din lipopolizaharide nu interacționează cu sistemele biologice și este netoxic. El este biodisponibil prin solubilizare în apă și biologic activ prin complexare cu purtători de natură proteică sau cu dextran, ca o precondiție a exprimării activității endotoxice.

Au fost decelate: un spectru larg de activități biologice, începînd cu pirogenitatea pentru om și iepure, toxicitatea letală, unele dăunătoare gazdei (coagulare intravasculară diseminată, hipotensiune, labilizarea lizosomilor și eliberarea enzimelor lor, cu lezarea celulelor respective, iar după trecere în sînge producerea de alterări celulare și șoc endotoxic). El are și unele acțiuni cu efect benefic, decurgînd din inducția unei rezistențe nespecifice la infecție, necroza tumorilor, inducerea toleranței la endotoxine, efectul adjuvant în imunizarea cu antigene bacteriene etc.

Lipidul A activează complementul, granulocitele, macrofagele și activitatea procoagulantă, este mitogen pentru limfocitele B și induce sinteza și eliberarea în organism a unui număr important de mediatori chimici ca: interleukina-1 (IL-1), interferonii, prostaglandinele și leukotrienele, factorul stimulator al coloniilor, factorul necrozant al tumorilor etc. IL-1, pirogenul endogen explică febra (fig. 208). Factorul necrozant al tumorilor este un mediator central al evenimentelor endotoxice (Beutler, Milsark și Cerami, 1985).

Evident, că în etapa actuală, deși endotoxinele au fost studiate foarte mult în ultimii ani, unele aspecte sînt încă nelămurite sau doar ipotetice și controversate. Astfel, unele din efectele benefice descrise ar putea reflecta activități fiziologice ale endotoxinelor eliberate permanent în doze extrem de mici de bacteriile Gram-negative din microbiota normală intestinală, în

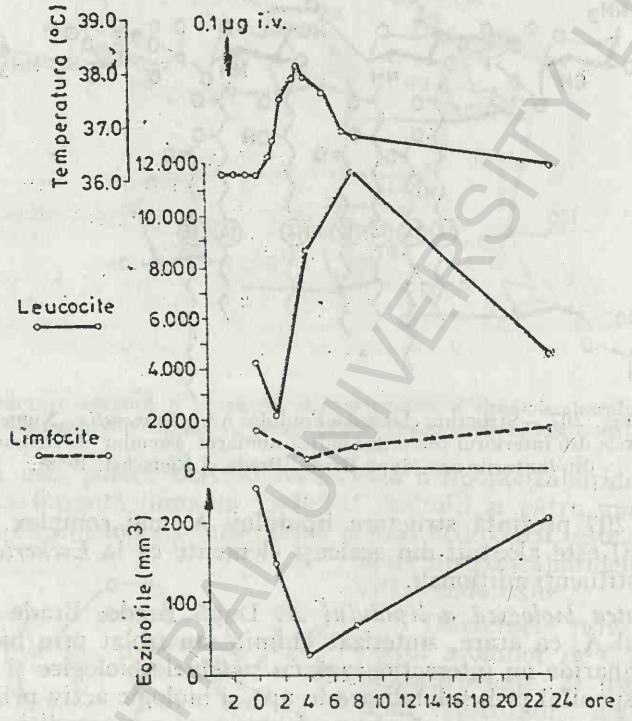



Fig. 208. — Efectul injecției intravenoase de lipopolizaharid *Escherichia coli* 08 (0,1 µg (0,0015 µg/kg) asupra temperaturii corpului și leucocitelor la om (după Westphal, 1974).

timp ce efectele dăunătoare sînt rezultatul producției de endotoxină în exces, avînd drept consecință dereglarea unor funcții de receptor natural, fiziologic. De altfel, nu se știe dacă unele din fenomenele toxice descrise sînt produse de endotoxină (respectiv de lipopolizaharide), de lipidul A sau de produșii toxici obținuți *in vivo* prin modificarea lor ca rezultat al interacțiunilor specifice cu factorii din ser (componenți ai complementului, ai sistemelor de coagulare, lipoproteinele cu densitate mare etc.

Un rol important revine macrofagelor activate de lipopolizaharide. Ele produc metaboliți pe calea acidului arahidonic, factori cu rol esențial în șocul endotoxic (Brade, Brade și Rietschel, 1988).

**Bazele celulare ale acțiunii endotoxinelor.** Bradley (1981) a propus un model molecular și celular care explică acțiunea endotoxinelor asupra organismelor sensibile (fig. 209).

Pătrunderea în celulă se realizează prin intermediul unor vezicule de endocitoză.

Ajunsă în citoplasmă, vezicula poate fuziona cu un lizosom, după care gruparea toxică a endotoxinei este transferată pe receptorul său specific, localizat în membrana mitocondrială.

Legarea de mitocondrie este urmată de perturbarea profundă a gradientului protonic mitocondrial și de acumularea unor cantități importante de ADP și NADPH în citosol.

Consecința imediat vizibilă este intensificarea glicolizei.

În același timp, endotoxina acționează asupra lizosomilor, determinînd inducția masivă a enzimelor acestora, stimularea autofagiei și eliberarea hidrolazelor lizosomale.

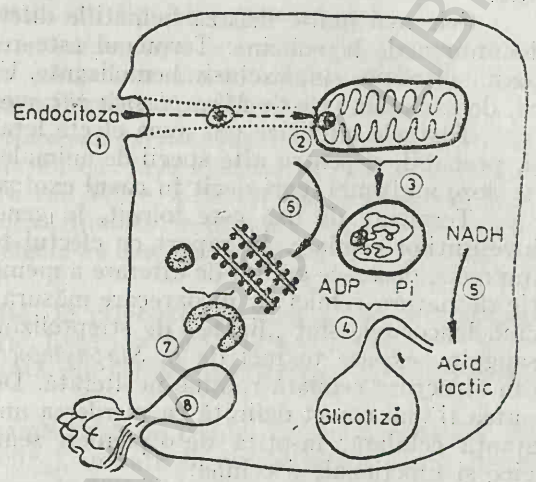



Fig. 209. — Bazele celulare ale acțiunii endotoxinelor. Reprezentare schematică prezentînd fazele de endocitoză **(1)**, translocația endotoxinei în mitocondrii **(2)**, distrugerea gradientului protonic **(3)**, acumularea de ADP și NADPH în citosol **(4, 5)** și de glicoliză mărită. Inducția enzimelor lizosomale **(6)** stimulează autofagia **(7)** și eliberarea hidrolazelor lizosomale **(8)** (după Bradley, 1981).

Rezultă, deci, că acțiunea endotoxinelor este condiționată de doi factori: 1) alterarea funcțiilor mitocondriale, evidențiată atît *in vitro*, în culturi de celule și fracțiuni celulare, cît și *in vivo*, după injectarea la animale; 2) activitatea enzimelor lizosomale în particular, a proteinazelor și a mediatorilor umorali eliberați de celulele lezate ale gazdei.

Ficatul capturează într-o oră ~ 80% din endotoxina injectată intravenos, asociind-o, în special, cu celulele parenchimatoase și respectiv cu fracțiunea mitocondrială. Rezultatul este epuizarea rezervei glucidice și hipoglicemie prin preluarea crescută a glucozei în țesuturile periferice și incapacitatea ficatului de a compensa pierderea.

Rinichii sînt măriți și prezintă edem interstițial în și în jurul glomerulilor, după 18 ore de la administrarea a 1—2 μg/kg — 10—20 mg/kg, cu infiltrare de leucocite în țesutul interstițial, congestie vasculară și creșterea N ureic în sînge de 3—5 ori.

După Bradley (1981), aplicînd o doză adecvată, virtual, orice organ poate fi lezat în mod corespunzător.

## TOXINELE CITOLITICE BACTERIENE

Toxinele citolitice sînt produse extracelulare de natură proteică, sintetizate în cursul creșterii bacteriilor, capabile să producă liza *in vitro* a uneia sau mai multor tipuri de celule de mamifere.

Au, în general, greutate moleculară mare: 59 kdal, toxina β, 68 kdal, toxina δ de la *Staphylococcus aureus*, 54 kdal, cereolizina etc. Greutatea moleculară mare este o particularitate deosebit de importantă, deoarece exclude, prin definiție, produșii metabolici litici, inclusiv antibioticele cu efect litic.

Cele mai multe lizează hematiile diferitelor specii animale de unde și denumirea de hemolizine. Termenul este restrictiv, deoarece numai puține toxine citolitice sînt exclusiv hemolizante. Unele pot liza și celule bacteriene, ca, de exemplu, cele de *Mycoplasma pneumoniae* și *M. laidlawii*.

Toxinele citolitice pot avea efecte letale pentru animalele de laborator și, probabil, și pentru alte specii de animale, dar acest efect este condiționat de doze mult mai mari decît în cazul exotoxinelor tipice.

Termenul de liză este folosit, în general, pentru a defini distrugerea învelișurilor celulare. În raport cu efectul toxinelor citolitice, el este relativ imprecis, deoarece gradul de alterare a membranelor celulare variază în funcție de natura celulei și, în oarecare măsură, de cea a agentului litic. Astfel, cînd leucocitele sînt „lizate" de streptolizina „O" (ca și în cazul plachetelor sanguine expuse toxinei de la *Staphylococcus aureus*), o parte importantă din structura celulară rămîne nealterată. De aceea, în acest context, liza ar putea fi mai corect definită ca pierderea unei cantități apreciabile de substanță celulară, însoțită de o pierdere semnificativă a integrității morfologice și funcționale a celulei.

Lista bacteriilor producătoare de proteine citolitice este foarte mare și a crescut constant în ultimii ani. Cele mai cunoscute sînt următoarele: *Staphylococcus aureus* (α-, β-, δ- și γ-toxine), *Streptococcus* sp. (streptolizinele „O" și „S"), *Clostridium welchii* (α- și θ-toxina), *C. caproicum*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. chauvei* (deltatoxine), *C. histolyticum* (ε-toxine), *C. tetani* (tetanolizina), *Bacillus cereus* (cereolizina), *B. laterosporus* (laterosporolizina), *B. alvei* (alveolizina), *B. thuringiensis* (turingiolizina), *Streptococcus pneumoniae* (pneumolizina) etc.

**Mecanismele de acțiune ale toxinelor citolitice.** Deși unele toxine citolitice au particularități enzimatice (tabelul nr. 34), ele nu pot fi asimilate global și univoc cu această categorie de substanțe.

*Tabelul nr. 34*

**Activitatea unor toxine citolitice și natura moleculelor-țintă respective**

| Bacteria producătoare | Toxina | Molecula-țintă |
|---|---|---|
| *Clostridium perfringens* | α-toxină | Fosfatidilcholină |
| *Clostridium perfringens* | K-toxină | Colagen |
| *Clostridium perfringens* | μ-toxină (hialuronidază) | Acid hialuronic |
| *Clostridium perfringens* | ν-toxină | ADN |
| *Staphylococcus aureus* | α-toxină (fosfolipaza C) | Fosfolipide |
| *Streptococcus pyogenes* | Streptolizina „O" | Colesterol |

Mecanismul lor de acțiune este diferit. Streptokinaza și stafilokinaza convertesc plasminogenul — proenzima inactivă — la plasmină, enzimă activă care digeră fibrina și împiedică coagularea sîngelui.

Toxinele alfa și theta (θ) de la *C. perfringens* de tip A determină necroze și leziuni ale țesutului conjunctiv, ale vaselor sanguine și ale țesutului muscular, precum și efecte sistemice care pot evolua spre toxemie letală.

Alfa-toxina, avînd particularități de fosfolipază C, este citolitică, respectiv hemolitică, prin lezarea membranei eritrocitelor, citotoxică dermonecrotică și letală prin degradarea fosfolipidelor membranare.

Beta-toxina de la *Clostridium oedematiens* este o sfingomielinază foarte activă pe hematiile de oaie, iar colagenaza atacă trama reticulară de susținere a mușchilor, fără a distruge fibrele musculare propriu-zise.

**Hemolizinele de la *Staphylococcus aureus*.** Efectele hemolitice și letale pentru iepure ale filtratelor culturilor de *Staphylococcus aureus* au fost observate încă din anul 1894, de către van Velde. Ulterior s-a demonstrat multiplicitatea hemolizinelor stafilococice (notate în ordinea cronologică a descoperirii lor: α, β, δ și γ) și aceste efecte au fost, în principal, atribuite toxinei, cel mai mult studiată de altfel.

*Hemolizina-α* este sintetizată, în principal, în faza de creștere logaritmică și în faza staționară timpurie. Este o proteină cu g.m. $10^4$ dal — $4{,}5 \times 10^4$ dal (respectiv 2,8—3,1 S), eliberată din celulele bacteriene intacte în cursul fazei maxime de sinteză.

Este citotoxică pentru o gamă largă de celule. Cele mai sensibile sînt hematiile de iepure (hemoliză 100%), urmate în ordine descrescîndă, de cele de șobolan (10%), șoarece (9%), om (0,8%), oaie (0,6—0%), cobai (0—0,1%), cal (0,06 %), maimuță (0). Prezintă și efect dermonecrotic și letal: 1 μg determină necroză extinsă în pielea de iepure, datorită spasmelor musculaturii netede a vaselor sanguine și ischemie gravă consecutivă. 1 μg injectat i.v. are efect letal pentru șoarece (mecanismul este încă obscur).

Din preparatele de hemolizină-α a fost izolat un procent mic de molecule cu constanta de sedimentare 12—16 S, reprezentînd, probabil, hemolizină polimerizată și inactivată. Examinată la microscopul electronic, după colorație negativă cu molibdat de amoniu, ele apar ca mici inele cu ∅ extern de 9—10 nm, dispuse pe suprafața fragmentelor de membrane celulare în șiruri rectangulare. După Bernheimer (1973), ele ar fi alcătuite din grupări hexagonale de șase subunități, fiecare avînd ∅ de 2,0—2,5 nm.

Alfa-toxina stafilococică este citotoxică pentru o gamă largă de celule și țesuturi. Ea acționează prin străbaterea stratului intern hidrofob al membranelor celulare ale mamiferelor, formînd pori transmembranari, care modifică permeabilitatea normală a celulelor-țintă. Formarea porilor este rezultatul polimerizării monomerelor toxinei (3,1—3,4 S), cu apariția de agregate de hexamere cu formă de inel. Regiunea centrală a inelului hexameric reprezintă porul transmembranar (Arbuthnott, 1988).

Alfa-toxina stafilococică acționează asupra circulației periferice, cordului și sistemului nervos central. Pe preparate de cord izolat produce constricție coronariană și stop cardiac. Este activă asupra vaselor sanguine mici, producînd spasme capilare și asupra centrului respirator.

Rolul său în patogenia infecțiilor stafilococice este încă insuficient cunoscut. Cu toate acestea, se poate considera că hemolizinele stafilococice, în general, și alfa-toxina, în special, reprezintă constituenți importanți ai spectrului larg, multifactorial, de mecanisme ce asigură virulența acestei bacterii.

# TOXINELE CRISTALIZATE DE LA *BACILLUS THURINGIENSIS*

Sub această denumire sînt reunite mai multe subspecii bacteriene patogene pentru larvele unor insecte, la care pot produce epizootii în natură.

Frecvent întîlnite în sol, bacteriile din acest grup se deosebesc de *Bacillus cereus*, cu care au fost asimilate inițial, prin apariția în cursul sporulării a unor incluzii parasporale cu proprietăți insecticide.

*B. thuringiensis* a fost izolat inițial în anul 1901, de către Ishiwata, din larvele muribunde dintr-o crescătorie de viermi de mătase și l-a denumit *Bacillus sotto* (jap. sotto — colaps). El a fost redescoperit în Thuringia, de către Berliner (1911), care l-a izolat de la larve bolnave de molia făinii *(Ephestia kühniella)*. Ulterior, Toumanoff și Vago (1952) au izolat de la larve de viermi de mătase moarte de flașerie o bacterie asemănătoare, considerată ca înrudită cu *B. cereus* și denumită inițial *B. cereus* var. *alesti* (după regiunea Ales din Franța).

Interesul pentru acest grup de bacterii a devenit efectiv după ce Angus (1954) a demonstrat că incluzia parasporală, care se formează în cursul sporogenezei, este un cristal proteic cu efect toxic asupra larvelor de lepidoptere.

Diferențierea bacteriilor din grupul *B. thuringiensis* se poate face în special pe trei criterii majore (Carlton și Gonzales, 1985):

1) după natura antigenelor flagelare (H), care a permis crearea unui sistem de clasificare în serotipuri (respectiv *serovar)* sau subspecii (de Barjac, 1981);

2) pe baza morfologiei și a structurii antigenice a cristalelor;

3) după natura plasmidelor purtate. Deși pot purta 2—3 pînă la 15 plasmide diferite, fiecare subspecie și chiar fiecare tulpină de *B. thuringiensis* are un profil plasmidial propriu, ce poate fi utilizat pentru caracterizare (Höfte și Whiteley, 1987).

Tulpina-neotip este *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (de Barjac, 1981).

Pe baza criteriilor descrise au fost diferențiate următoarele subspecii: *alesti, aizawai, canadensis, darmstadtiensis, dendrolimus, entomocidus, finitimus, galleriae, indianae, israelensis, kurstaki, kumamotoensis, keniae, kyushuensis, morrisoni, nigeriae, ostriniae, pakistani, subtoxicus, San Diego, tenebrionis, tolworthi, tokokuensis, tochigiensis, toumanoffii, thompsoni, wuhuenensis, yunnaensis* (Aronson, Beckman și Dunn, 1986).

## Cristalele (incluziunile) parasporale

Sinteza cristalelor parasporale este corelată cu sporogeneza. Este inițiată în stadiile II sau III ale sporulării, respectiv în perioada formării și completării septului sporal și ajunge la dimensiunea maximă (aproximativ egal cu sporul) în stadiul IV.

Cristalele au formă și compoziție chimică variabile după subspecie. Cel mai frecvent bipiramidale, pot avea și formă de romb, romboid, biprismatică sau de cub cu marginile rotunjite.

Numărul și mărimea subunităților proteice prezente într-un cristal natural sînt nesigure. Există numeroase diferențe între numeroasele tulpini de *B. thuringiensis*, chiar la același serotip (serovar), probabil datorită înglo-

bării de proteinaze contaminante, provenite din mediul intracelular puternic proteolitic în momentul formării sporului. În general, reprezintă între 20 și 30% din greutatea uscată a bacteriilor.

Calabrese, Nickerson și Lane (1980) au grupat proteinele izolate din diferite tulpini de *B. thuringiensis*, în funcție de profilul lor electroforetic, în trei categorii:

1) Tipurile I și II corespund formei bipiramidale și au g.m. de 140—160 kd și respectiv 60—150 kd.

2) Tipul III corespunde formei tetraedrice și are g.m. de 40—50 kd.

Cele mai multe proteine de cristal sînt pretoxine („protoxine"), care în intestinul larvelor sînt convertite prin clivare proteolitică la polipeptide mai mici, toxice.

Sinteza lor s-ar face pe seama aminoacizilor rezultați din degradarea proteinelor celulare, în cursul unui proces de turnover intens proteic, care coincide cu faza precoce a sporulării.

*Cristalele bipiramidale*, cel mai mult studiate, rezultă din asamblarea unui număr mare de subunități proteice (pretoxine), cu g.m. de 140—160 kd. Ele au formă de baghete sau de haltere, cu dimensiunea de 11,8 μm × 4,7 μm și sînt legate covalent sau necovalent. Fiecare subunitate este un dimer al unui polipeptid unic, care conține trei segmente distincte:

1) regiunea N-terminală, corespunzătoare domeniului „stabil", care include componentul toxic;

2) regiunea C-terminală este partea expusă degradării proteolitice nespecifice;

3) regiunea intermediară, centrală („Core"), este un segment „cheie", deoarece include secvența de aminoacizi expusă acțiunii proteazelor specifice cu funcție esențială pentru activarea toxinei.

### Bazele genetice ale sintezei cristalelor insecticide

Sinteza proteinelor din cristalele parasporale are loc începînd din stadiul II al sporulării, pornind de la molecule de ARNm cu viață lungă, transcrise preferențial de una din ARN polimerazele specifice sporulării (Lereclus, 1988). Ea continuă în stadiile III și IV cînd cristalele ajung la dimensiunile maxime (fig. 210). După terminarea sporulării, peretele sporangelui este lizat, iar sporul și cristalul sînt eliberate în mediu (Höfte și Whiteley, 1989).

Sinteza cristalelor parasporale este, deci, riguros corelată la *B. thuringiensis* cu sporularea—proces complex, ale cărui evoluție și reglare sînt asigurate de peste 60 de gene, care „simt" lipsa de nutrienți și prezența altor forme de stress ce determină derepresia lor.

Studiile de genetică moleculară au demonstrat că la cele mai multe subspecii, gena care codifică proteina din structura cristalului — notată *cry* („Crystal protein") este localizată în structura unei plasmide și numai rar pe cromosomul bacterian. *B. thuringiensis* poartă un spectru larg de plasmide (2—15 tipuri), în general cu dimensiuni mari (30—150 Mdal) și cu caracter de conjugon (Carlton și Gonzales jr., 1985), favorizînd transmiterea lor de la o tulpină la alta prin conjugare.

Genele *cry* sînt, de regulă, delimitate de secvențe de inserție, fapt care le conferă caracterul de transpozoni (Tn)*. Această particularitate de struc-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 124.

tură sugerează posibilitatea transferului lor de la o plasmidă la alta sau de pe o plasmidă pe cromosom și invers (Whiteley și Schnepf, 1986).

Tulpinile *cry*⁻ nu conțin plasmide. Fără a putea generaliza, se poate afirma că, în mod obișnuit, producerea de cristale parasporale este corelată cu prezența plasmidelor.

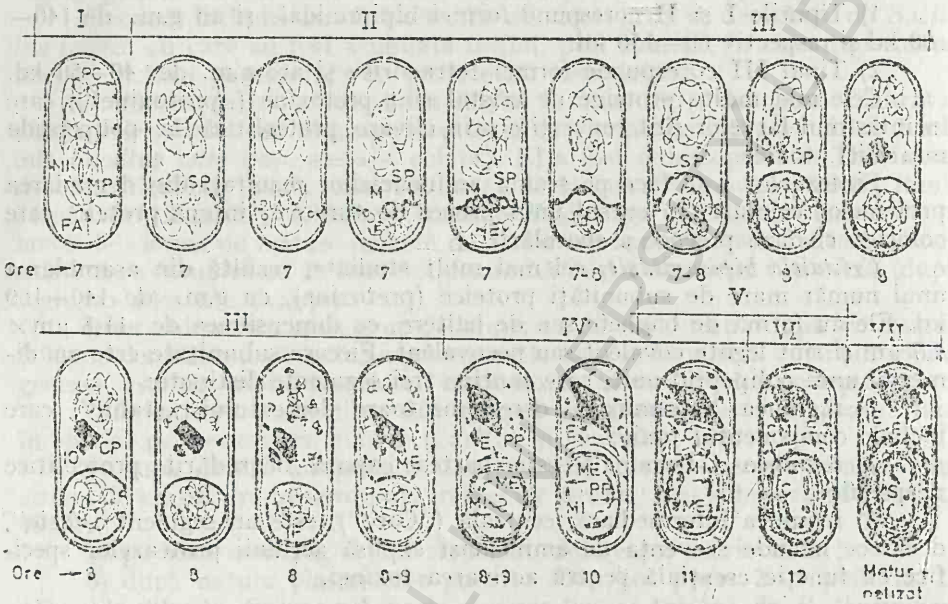



Fig. 210. — Reprezentarea schematică a sporulării la *Bacillus thuringiensis*: M = mezosom; PC = perete celular; MP = membrana plasmatică; FA = filament axial; SP = septul presporului; PI = prespor incipient; IO = incluziune ovoidă; CP = cristal parasporal; P = prespor; MI = membrană internă; ME = membrană externă; PP = perete celular primordial; E = exospor; IL = înveliș sporal lamelar; IE = înveliș sporal extern; C = cortex; CMI = citoplasma celulei-mamă încorporată; S = spor matur în sporangiu nelizat (după Bechtel și Bula jr., 1976).

Au fost izolate pînă în prezent 12 gene *cry* și o genă *cyt*. Cele mai multe au fost secvențializate și clonate. Ele pot fi grupate în cinci clase, pe baza *spectrului* de activitate insecticidă și a relațiilor de omologie în secvența aminoacizilor din proteinele pe care le codifică (Hofte și Whiteley, 1989) (tabelul nr. 35).

*Genele cry I* codifică proteine (g.m. 130—140 kd) toxice pentru lepidoptere. Ele se acumulează în corpi cristalini parasporali tipici, bipiramidali. Proteinele produse de genele *cry A* au fost notate inițial $P_1$. Proteinele genelor *cry I B* și *cry I C* sînt foarte active numai pe o singură specie din lepidopterele testate.

*Genele cry II* codifică proteinele numite anterior $P_2$, care sînt asamblate în incluziuni cuboidale.

Proteinele codificate de gena *cry II A* de la *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *tolworthi* și *keniae*, fiind bifuncționale, sînt active nu numai pe *Lymantria dispar* și *Heliotis virescens*, ci și pe diptere *(Aedes aegypti)*.

*Tabelul nr. 35*

**Clasificarea genelor pentru toxina insecticidă prezente la diferite subspecii de** *Bacillusthuringiensis* (după Hofte și Whiteley, 1989)

| Subspecia | Tipul de genă | Mărimea proteinei (kd) | Activitatea insecticidă |
|---|---|---|---|
| *kurstaki* | cry I A(a) (4,5 $P_1$) | 133 | Lepidoptere |
| *sotto* | cry I A(c) (6,6 $P_1$) | 133 | Lepidoptere |
| *aizawai* | cry I A(b) (5,3 $P_1$) | 130 | Lepidoptere |
| *thuringiensis* | cry I B | 145 | Lepidoptere |
| *aizawai* | cry I C | 135 | Lepidoptere |
| *kurstaki* | cry II A | 71 | Lepidoptere și diptere |
| *kurstaki* | cry II B | 71 | Lepidoptere |
| *morrisoni* | cry III A | 73 | Coleoptere |
| *israelensis* | cry IV A | 134 | Diptere |
| *israelensis* | cry IV B | 128 | Diptere |
| *israelensis* | cry IV C | 72 | Diptere |
| *israelensis* | cry IV D | 72 | Diptere |
| *israelensis* | cry A | 27 | Factor citolitic |

*Genele cry III*, prezente la *B. thuringiensis tenebrionis* sau *san Diego* și *morrisoni*, codifică o proteină (72 kd) asamblată în cristale romboidale, active pe coleoptere și în mod special pe gîndacul de Colorado *(Leptinotarsa decemlineata)*.

*Genele cry IV* formează un grup heterogen, notat IV A, IV B, IV C și IV D, care codifică o proteină de cristal parasporal ovoid, activă exclusiv pe diptere.

*Genele cyt A* codifică o proteină cristalină nespecifică, cu g.m. 27 kdal, cu acțiune citolitică asupra unui număr mare de celule testate, provenind atît de la nevertebrate, cît și de la vertebrate. Au fost descrise la *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, asociate cu toxina specifică pentru diptere.

Studiile genetice demonstrează că unele varietăți de *B. thuringiensis* conțin mai multe gene *cry* diferite și, în consecință, pot sintetiza mai multe toxine diferite, dar înrudite.

Astfel, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* conține genele *cry A(a)*, *cry II A*, *cry III A* și *cry II B*, ceea ce explică activitatea dublă pentru lepidoptere și diptere. În același timp, aceeași genă *(cry A(b))* este întîlnită la subspecii diferite *(B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* și *aizawai)*. Marea omologie dintre genele *cry*, precum și dintre proteinele codificate sugerează că ele derivă, cele mai multe, dacă nu toate, dintr-o genă comună, ancestrală.

Unele subspecii *(finitimus, dakota* etc.) produc cristale netoxice pentru lepidopterele sau dipterele comune. Semnificația lor este necunoscută: sînt cristale „mutante" sau toxice pentru gazde încă neidentificate.

În sfîrșit, unele tulpini sînt invazive și pot produce septicemii.

### δ-endotoxina

Termenul de δ-endotoxină trebuie rezervat formei active a proteinei $P_1$ din structura cristalelor parasporale. Ea este sintetizată sub forma unei

pretoxine („protoxine"), cu g.m. de 130—160 kd, lipsită de activitate biologică.

Toxicitatea este condiționată de dezasamblarea cristalului proteic și de clivarea moleculelor proteice. În condiții naturale, activarea are loc în intestinul larvelor unor insecte, unde valorile de pH variază, după caz, între 9,0 și 10,5, datorită unei mari cantități de $K_2CO_3$ (Aronson, Beckman și Dunn, 1986). Clivarea este efectuată de proteinazele intestinale cu activități similare tripsinei și chemotripsinei. Prin clivare rezultă mai multe peptide cu greutăți moleculare cuprinse între 40—60 și 80 kd. După datele cele mai noi, componentul activ al δ-endotoxinei ar avea între 55 și 70 kd și ar fi localizat în regiunea aminoterminală a pretoxinei. Produșii cu g.m. mai mică sînt inactivi datorită lezării centrului activ al moleculei.

Specificitatea și gradul de toxicitate ale δ-endotoxinei elaborată de diferitele serotipuri de *B. thuringiensis* variază în limite foarte mari. Uneori sînt legate de diferențe cantitative în capacitatea de producere a toxinei, alteori de natura polipeptidelor din cristal sau de biochimia intestinului insectei.

Haider și colab. (1986), lucrînd cu δ-endotoxine de la *B. thuringiensis* var. *aizawai* (sin. var. *colmeri)*, au demonstrat că specificitatea de acțiune poate fi determinată de clivarea proteolitică diferențiată a pretoxinei de către proteinazele gazdei. Deși sînt derivate din aceeași proteină, polipeptidele rezultate din clivarea diferențiată recunosc receptori diferiți. Astfel, cînd protoxina este activată de proteinazele din intestinul lepidopterelor se obține o δ-endotoxină activă *in vivo* sau *in vitro* numai pe celule de lepidoptere (Haider și Ellar, 1987). Clivarea a 15 aminoacizi din structura toxinei active pe lepidoptere (55 kd) are ca rezultat obținerea unui polipeptid cu g.m. de 53 kd, formă specifică pentru diptere, care se leagă de alt receptor membranar, recunoscînd o proteină membranară de la *Aedes aegypti*. Clivarea diferențiată asigură moleculei o conformație alternativă și, ca urmare, o specificitate diferită.

În consecință, activitatea δ-endotoxinelor este condiționată de mai mulți factori care includ:

1) Caracteristicile polipeptidelor din cristalul nativ.

2) Biochimia celulelor intestinale ale larvei, respectiv prezența receptorilor pe celulele-țintă. Toxina specifică pentru lepidoptere recunoaște componente glicoproteice (în particular, gruparea GalNac), iar cea activă pe diptere, molecule lipidice.

3) Nevoia de pH alcalin și de prezența unor proteinaze alcaline intestinale.

4) Diferențele în capacitatea de prelucrare a toxinei, de legare de intestin sau de producerea de către bacterii a unor toxine adiționale încă necunoscute.

### Mecanismul de acțiune al δ-endotoxinei

Deși, în ansamblu, mecanismul de acțiune al δ-endotoxinei este încă neelucidat, există un acord în ceea ce privește situsul primar de interacțiune al acesteia cu epiteliul intestinal al larvelor sensibile: legarea de un receptor specific glicoproteic, care conține un rest de GalNac (N-acetil galactozamină) (Knowles, Thomas și Ellar, 1984). Această afirmație se bazează pe

observația că preincubarea toxinei specifice pentru lepidoptere — activată *in vitro* — în prezența N-acetil galactozaminei și a acidului N-acetil muramic (NeuNac), are drept consecință anularea efectului toxic pentru larvele de *Pieris brassicae* și *Choristoneura fumiferana*. Deoarece membranele celulare ale insectelor nu conțin acid N-acetil muramic, rezultatele demonstrează că toxina recunoaște un receptor specific glicoconjugat, care are în structura sa un rest de N-acetil galactozamină.

Același efect inhibitor asupra toxicității au și lecitinele aglutinante din soia, care leagă, de asemenea, N-acetil galactozamina. Efectul se explică prin competiția dintre lectină și toxină pentru același situs de legare pe suprafața celulei.

Efectul toxic este condiționat, de asemenea, de clivarea specifică a toxinei sub acțiunea serinproteazelor, cu pH optim 9,5—10,0, sau a proteazelor alcaline (pH 12,0). (Calabrese, Nickerson și Lane, 1990).

După legare, evenimentul toxic inițial este reprezentat de producerea unor „pori" în membrana plasmatică, fie direct, prin inserția toxinei în structura acesteia, fie indirect, prin perturbarea arhitecturii proteinelor și fosfolipidelor membranare. Termenul de „por" nu desemnează o entitate fixă, respectiv o „gaură" permanentă în membrană, ci poate corespunde unei disfuncții sau unei stări funcționale particulare care implică o modificare de permeabilitate.

Efectul următor imediat este reprezentat de un dezechilibru ionic, manifestat printr-un influx net de ioni în celulă, urmat de un influx de apă. „Umflarea" consecutivă a celulelor este urmată fie de lărgirea porilor existenți, fie de apariția altora noi. Inițial, porii sînt impermeabili pentru macromoleculele interne (proteine și acizi nucleici), însă după umflarea celulelor trec la exterior molecule din ce în ce mai mari ca în liza hipotonică. Procesul necesită prezența $Na^+$ și $K^+$.

În favoarea acestui mecanism pledează următoarele fapte de observație:

1) umflarea celulei înainte de liză;

2) trecerea la exterior, inițial a moleculelor mici și apoi numai a celor mari;

3) efectul protectorilor osmotici, care inhibă sau întîrzie citoliza. Moleculele mai mari împiedică complet citoliza, în timp ce moleculele mai mici întîrzie toxicitatea, într-un grad dependent de mărimea lor, respectiv de timpul necesar pentru a pătrunde în celulele cu pori;

4) pe baza protecției conferite de moleculele cu dimensiuni cunoscute se apreciază că mărimea leziunilor toxice primare (porilor) induse de δ-endotoxină ar corespunde unei raze de 0,5—1,0 nm (asemănătoare celei produse de enzimele citolitice).

Aceste date demonstrează că efectul major al δ-endotoxinei se exercită pe suprafața celulelor-țintă și ar fi similar celui indus de detergentul Triton X-100. Un prim argument în sprijinul acestei concepții se bazează pe faptul că el poate fi reprodus cu toxina imobilizată pe un suport de Sephadex, deci incapabilă de pătrundere în celulă. Un alt argument este reprezentat de rapiditatea efectului: toxina produsă de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* induce primele efecte după un minut, în timp ce toxinele cu ținte intracelulare (toxina difterică) prezintă o perioadă de latență de aproximativ 40 minute.

Nickerson (1982), precum și Muthukumar și Nickerson (1987), lucrînd cu δ-endotoxina produsă de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, consideră că

aceasta ar acționa ca un ionofor pentru anioni. Toxinele produse de celelalte subspecii ar acționa ca transportori de cationi (Schell și Nickerson, 1983). Datorită greutății moleculare mari și capacității de autoasamblare, δ-endotoxinele s-ar putea constitui ca ionofori de tip „canal", care străbat stratul dublu fosfolipidic al membranei plasmatice.

Ipoteza explică dezechilibrul intracelular și intramitocondrial, precum și modificările intracelulare premergătoare citolizei, între care cele mai semnificative sînt următoarele: perturbarea transportului ionilor și glucozei, a înglobării $O_2$, decuplarea proceselor producătoare de energie de cele de stocare a ei, în cursul fosforilării oxidative, și scăderea drastică a concentrației ATP în celulele expuse acțiunii toxinei.

Ipoteza se bazează pe următoarele date:

1) cuplarea producerii de energie cu procesul de stocare este dependentă de concentrația ionică;

2) diferiți ionofori studiați (valinomicina, gramicidina etc.) au efect decuplant în fosforilarea oxidativă;

3) restabilirea echilibrului ionic celular se face cu consumarea de ATP, fapt care agravează scăderea concentrației acestuia în celulă.

În ansamblu, aceste modificări alterează profund permeabilitatea celulară.

### Simptome și leziuni produse de δ-endotoxine

Primele simptome apar la cîteva minute de la ingerarea cristalelor: larvele încetează să se hrănească, datorită paraliziei mandibulei și a tubului digestiv. După 5—10 minute apar leziuni la nivelul microvilozităților (situate pe suprafața luminală a celulelor columnare), care devin mai scurte, mai mari și mai rare. Urmează umflarea și vacuolizarea celulelor, modificarea membranelor celulelor adiacente și apariția de spații intercelulare, ca și „umflarea" mitocondriilor, cu dispariția structurii lamelare, a cristalelor și final liza lor etc. După 20—25 minute, celulele se distrug prin șoc osmotic. Ionii și diferite substanțe trec din lumenul intestinal în hemolimfă, provocînd paralizia (prin blocarea circulației influxului nervos) și moartea larvelor.

### Alte toxine

**α-exotoxina** este o toxină-enzimă sintetizată în cantități importante de *B. thuringiensis* și de *B. cereus* în faza vegetativă. Este de natură proteică și are funcția de fosfolipază C sau lecitinază.

Este activă pe insecte și pe șoarece („factorul șoarece").

**β-exotoxina** *(thuringiensină)* este produsă, de asemenea, în cursul creșterii vegetative de unele subspecii de *B. thuringiensis*. Este termostabilă (rezistă 15 minute la autoclavare) și hidrosolubilă. De natură nucleotidică, β-exotoxina conține adenină, riboză, glucoză, acid alaric și o grupare fosfat. Îndepărtarea grupării fosfat prin hidroliză cu fosfataze alcaline duce la pierderea toxicității (Lüthy, 1980).

Este mai puțin specifică. Omoară diferite insecte, fiind în special activă pe musca domestică („Fly factor") și pe *Aedes aegypti*. Ar acționa prin inhibarea sintezei ARNm, datorită interferenței cu ARN polimerazele. Acest mecanism de acțiune explică spectrul larg de gazde sensibile. Are efecte tera-

togene pentru coleoptere, diptere și lepidoptere. Afectează unele nevertebrate și vertebrate. Ar conține un peptid încă necaracterizat cu acțiune antibiotică asupra mai multor microorganisme. Utilizarea în combaterea dăunătorilor este neautorizată (Kirschelbaum, 1985).

**Exoenzime.** Tulpinile de *B. thuringiensis* pot să producă o serie de exoenzime ca, de exemplu:

**Lecitinaze** cu efect asupra membranelor plasmatice. Ele facilitează trecerea microorganismelor din intestin în hemocel unde se pot multiplica. Ar acționa ca un factor de virulență.

**Chitinaze.** Au un efect slab asupra patogenității. Acționează pe membrana peritrofică, facilitînd accesul δ-endotoxinei la epiteliul intestinal.

**Hemolizine** *(thuringiolizina)*, în curs de studiere.

Acționînd complementar sau sinergic, diferitele toxine și enzime reprezintă un factor important în biologia *B. thuringiensis*, favorizîndu-i proliferarea în nișele sale ecologice.

După Aronson, Beckman și Dunn (1986), producerea de toxine și fenomenele asociate ar avea, în plus, rolul de a permite accesul bacteriilor patogene la o nișă ecologică unică — hemolimfa — mediu nutritiv excelent pentru proliferare, la care în mod normal aceste microorganisme nu au acces.

### Bacillus thuringiensis serovar israelensis

A fost izolat, în anul 1977, în Israel (deșertul Negev), din larve moarte de țînțari *(Culex)*. Produce 2—4 incluziuni parasporale, cu mărimi și forme neregulate (ovoide, bipiramidale, cubice sau amorfe), putînd fi asamblate într-o singură incluziune parasporală. Uneori sînt înconjurate de un înveliș comun.

Toxina este de natură glicoproteică, fiind formată din glucozamine (70%), galactozamină (25,6%), glucide neutre (2,7 %) și glucide aminate (1,7%). Componenta glucidică ar reprezenta aproximativ 5,6% din greutatea cristalului și ar fi în parte încorporată ca impurități în cursul sporulării (Bulla jr., 1977).

Peanne și Stiel (1984) au demonstrat posibilitatea de a obține prin dezasamblarea cristalelor, cinci polipeptide, dintre care trei, acționînd sinergetic, ar fi răspunzătoare de efectul toxic.

Astfel, δ-toxina ar fi, în realitate, un dimer cu g m. de 230 kd, care conține toxina $P_1$ (g.m. 135 kd), codificată de gene plasmidiale, și toxina $P_2$, cu g.m. de 65 kd, activă atît pe lepidoptere, cît și pe diptere *(Aedes, Anopheles, Culex* și *Simuliide)* (Calabrese, Nickerson și Lane, 1980). Doza toxică este asigurată de o suspensie care conține 2 ng/ml. Toxina se leagă de receptori asemănători lectinelor de pe suprafața epiteliilor intestinale, care recunosc anumite grupări glucidice specifice din structura moleculei de toxină (Muthukuman și Nickerson, 1987).

A fost propusă și o ipoteză alternativă, conform căreia toxina s-ar comporta ca o lectină, recunoscînd un component glucidic de pe suprafața mucoasei intestinale a larvei. Este posibil ca receptorul-țintă să facă parte dintr-un sistem de endocitoză de tipul celor descrise la alte celule animale*, ceea ce ar permite o concentrare mare intracelulară a moleculelor toxice.

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, p. 358.

Un alt component toxic este reprezentat de toxina citolitică (g.m. 28 kd). Ea se leagă de fosfatidilcholină, sfingomielină, fosfatidiletanol amină, fosfatidilserina din structura dublului strat fosfolipidic al membranei plasmatice a celulelor intestinale ale larvelor.

Larga răspîndire a acestor componenți în structura membranară a celulelor eucariote explică efectul nespecific al toxinei citolitice *in vitro*, care este activă pe celule de lepidoptere, de diptere și de mamifere. Efectul este asemănător celui al detergenților. Este hemolitică și determină la șoarece fenomene neurologice și moarte. După unii cercetători, toxina citolitică s-ar insera în stratul fosfolipidic, formînd canale hidrofile în membrana plasmatică, permițînd astfel pierderea conținutului celulei și liza acesteia.

### Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki

Produce o pretoxină glicoproteică, cu g.m. de $6{,}8 \times 10^4$ dal. Molecula nativă este atacată în intestinul larvelor de proteinaze. Conține două componente toxice: δ-endotoxina $P_1$ specifică pentru lepidoptere și $P_2$ („Mosquitocide factor"), care omoară atît lepidoptere, cît și diptere (Miller, Lingg și Bulla jr., 1983).

Prezintă un spectru foarte restrîns de activitate, condiționat de legarea de receptori strict specifici. Are însă o mare viteză de acțiune. *In vitro* exercită efect citolitic rapid datorită modificării brutale a permeabilității celulare (Yamamoto și McLaughin, 1981).

### Bacillus thuringiensis subsp. san Diego

Produce o δ-endotoxină activă pe gîndacul de Colorado și pe mai multe alte coleoptere. Toxina este reprezentată de un cristal rectangular, care conține o proteină cu g.m. de 65 kd.

### Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis

Descris de Kreig (1983), are o activitate specifică față de coleoptere. Formează cristale rectangulare, care pot fi disociate în cinci polipeptide diferite, derivate de la o genă unică, fie prin proteoliză, fie ca produși primari ai traducerii genetice. Gena pentru toxină a fost izolată și clonată în *Escherichia coli* și *Pseudomonas fluorescens*, care produc o proteină biologic activă pe gîndacul de Colorado (McPherson, 1988).

### Bacillus sphaericus

Izolat de Neide (1904) de la *Culiseta incidens*, este denumit astfel datorită formei sferice a sporului.

Conține tulpini cu virulență foarte diferită, variind de la efecte letale la patogenitate slabă sau chiar lipsă de patogenitate. Tulpinile foarte patogene conțin cristale parasporale ca sursă unică sau majoră a efectului larvicid. În unele tulpini, cristalele sînt poliedrice, parasporale și au structură de rețea cristalină, cu striații la distanță de 6,3 nm. În altele, incluziunile apar sub forma unor corpuri elipsoidale sau ovalare, cu structură cristalină, care nu-și modifică aspectul în cursul trecerii prin intestinul larvar (Yousten, 1984) în stadiile timpurii ale sporulării.

Toxina nativă (g,m, 125 kd) apare ca un precursor al proteinelor active (g.m. 110 kd, 63 kd și 43 kd).

Proteinele avînd g.m. de 63 kd și 43 kd sînt codificate de gene diferite.

*B. sphaericus* este activ pe larvele de *Anopheles* și *Culex*. *Aedes aegypti* este rezistent. Primele efecte toxice apar după 30 minute de la administrare. Omoară după 4—6 ore. Este un larvicid ideal pentru mediile acvatice (Yousten, 1984; Baumann și colab., 1987).

## MICROORGANISMELE CA AGENȚI DE COMBATERE BIOLOGICĂ A ARTROPODELOR

**„Utilizarea microorganismelor în scopul reglării populațiilor de insecte într-o regiune definită reprezintă un demers incitant pentru ecologie și pentru biologia moleculară".**

L. K. Miller
A. J. Linng
L. A. Bulla

Numeroase insecte și acarieni acționează ca dăunători în agricultură și silvicultură, producînd pagube economice enorme. În plus, pot transmite diferiți agenți patogeni pentru plante, animale, ca și pentru om. Interesul pentru utilizarea microorganismelor ca bioinsecticide și bioacaricide este, în mare măsură, rezultatul problemelor asociate cu utilizarea pesticidelor chimice. În prezent, se apreciază că sînt utilizate în practică peste 1 500 de microorganisme și produse ale lor cu scopul reducerii dependenței de pesticidele chimice (Carlton, 1960). Ele includ bacterii, microfungi și protozoare, patogene în condiții naturale, prezente pe suprafața plantelor și/sau în sol* (Aronson, Beckman și Dunn, 1986). Argumentele în favoarea utilizării bioinsecticidelor decurg din inconvenientele pesticidelor chimice de sinteză:

1) Majoritatea insectelor dăunătoare devin rezistente la diferite clase de insecticide chimice folosite împotriva lor. Rezistența dobîndită implică utilizarea unor doze mai mari, cu consecințe grave pentru mediu și efecte economice negative, precum și nevoia de a sintetiza substanțe chimice progresiv mai toxice. În anul 1980, 600 de specii de insecte dăunătoare erau rezistente la unul sau la mai multe insecticide chimice (Metcalf, 1983). Numărul lor se dublează la fiecare șase ani, încît este de așteptat ca în anul 2000, practic, toți dăunătorii să prezinte un anumit grad de rezistență (Rowe și Margaritis, 1987).

2) Argumentele majore sînt de ordin ecologic. Datorită spectrului larg de acțiune, practic lipsei de selectivitate, insecticidele chimice omoară și insectele utile. Ele afectează echilibrul natural al populațiilor respective

* În afară de microorganisme, numeroase virusuri sînt entomopatogene și unele dintre ele sînt aplicate sau studiate în vederea aplicării, în cadrul combaterii integrate a dăunătorilor agricoli și silvici. Ele au rol natural în reglarea numerică a populațiilor respective. Aparțin genurilor *Baculovirus, Iridovirus, Parvovirus, Picornavirus, Poxvirus* ș. a. (Haider și Ellar, 1987; Moore, King și Posee, 1987).

în natură, pot favoriza dezvoltarea excesivă a unor specii rezistente, care nu mai pot fi controlate datorită dispariției prădătorilor lor naturali distruși sub acțiunea pesticidelor chimice (Burges, 1982).

3) Costul social al utilizării pesticidelor chimice este imens, prin poluarea mediului, prin încorporarea lor în organismele vegetale și animale, prin afectarea sănătății omului. Unele pesticide sau produși rezultați din degradarea lor parțială au efect oncogen.

### Bacteriile

Deși numărul speciilor bacteriene entomopatogene este mai mare de o sută *(Bacillaceae, Micrococcaceae, Lactobacillaceae, Pseudomonaceae)*, (Miller și colab., 1983), numai cîteva sînt utilizate curent în unele țări pentru combaterea dăunătorilor agricoli și forestieri sau a unor insecte cu importanță medicală.

Bacteriile entomopatogene, cele mai multe sporulate, se deosebesc prin modul în care infectează insectele, prin spectrul de gazde, stadiul sensibil la acțiunea lor (larvă sau adult), locul multiplicării în organismul acestora, mecanismul patogenității etc.

**Bacillus thuringiensis**, cel mai frecvent utilizat în practică și cel mai mult studiat (vezi cap. „Toxinele cristalizate"), a fost descoperit în anul 1902 de Ishiwata. Prezintă mai multe serotipuri/serovar (descrise de unii cercetători ca subspecii), utilizate în preparate comerciale.

Administrarea lor se face sub formă de pulberi, care conțin un amestec de spori, cristale și diferite particule, sau ca suspensii în mediu lichid, la care se adaugă xilen 3—4% pentru a împiedica germinarea sporilor în preparat și contaminarea cu alte bacterii sau microfungi. Sub raportul condiționării, încapsularea într-un înveliș protector realizează, după cum s-a demonstrat, protecția față de ploaie, de variațiile de pH, de exsudatele plantelor, ca și de alți factori de mediu (Carlton, 1991).

*Insectele sensibile.* Lista speciilor de insecte ce pot fi combătute cu preparate bacteriene pe bază de *B. thuringiensis* include peste 140 de specii și a crescut în ultimii ani datorită descoperirii unor noi subspecii de bacterii active.

Ea include, în special, următorii dăunători: *Ostrinia nubilalis* Hb (sfredelitorul tulpinilor de porumb), *Thaumetopoea processionea* L. (omida procesionară a stejarului), *T. pityocampa* Schiff (omida procesionară a pinului), *Limantria dispar* L. (omida păroasă a stejarului), *Tortrix viridiana* L. (molia verde a stejarului), *Euproctis chrysorrhoea* L. (fluturele cu abdomenul auriu), *Operophtera (Cheimatobia) brumata* L. (cotarul verde), *Erannis (Hibernia) defoliaria* L. (cotarul brun), *Grapholita funebrana* (viermele prunelor), *Hyponomenta mallinellus* Zell (molia frunzelor de măr), *Pieris brassicae* L. (fluturele alb al verzei, nălbarul), *P. rapae* L. (albilița rapiței), *Plutella maculipennis* Curt (molia verzei), *Malacosoma neustria* L. (inelarul), *Lobesia botrana* Den et Schiff (molia verde a strugurilor), *Barathra (Mamestra) brassicae* L. (buha verzei) ș.a.

Acestora li s-au adăugat în ultimii ani: *Leptinotarsa decemlineata* (gîndacul de Colorado) și unele insecte cu importanță medicoveterinară sau producătoare de disconfort *(Aedes aegypti, Anopheles stephensi, A. sergenti, A. annulipes, Culex pipiens, C. univitalus, C. annulirostris, C. quinque jasciа-*

*tus*, *Leranotaenia unguiculata*, *Simulium damnosum* (musca columbacă), *Ensimulium* sp., *Odagmia* sp.

În S.U.A., diferitele serovar de *B. thuringiensis* sînt utilizate anual sub forma a peste 410 preparate comerciale în cantități de peste 2,3 milioane kg pentru combaterea dăunătorilor agricoli și forestieri (Rowe și Margaritis, 1987).

**Bacillus popilliae și B. lentimorbus** infectează un spectru limitat de gazde, reprezentate de coleopterele din familia *Scarabeidae*, ca, de exemplu, gîndacul *Popillia japonica*. Aceștia se hrănesc pe mai mult de 300 de specii de plante, producînd pagube enorme. În țările în care gîndacii au antagoniști naturali (Japonia), ei nu pun probleme speciale, în schimb, în S.U.A., unde dăunătorii lor lipsesc, se scontează mult pe rolul bioinsecticidelor bacteriene (tip Doom). Larvele se infectează ingerînd sporii, care germinează în intestin, se multiplică și străbat peretele acestuia, trecînd în hemocel. Final, hemocelul este plin cu bacili și spori ovali, în așa fel încît larvele devin opalescente („Milky disease").

*B. popilliae* și *B. lentimorbus* nu afectează insectele adulte. Sporii lor persistă în sol cîțiva ani, avînd deci un efect de control îndelungat.

**Pseudomonas aeruginosa**, deși este un bioinsecticid activ, nu este folosit deoarece este patogen-oportunist pentru om. În plus, este în special activ pe insecte stresate sau lezate și nu persistă vreme îndelungată pe tulpinile și frunzele plantelor tratate.

**Xenorhabdus nematophilus** este prezentă în sistemul digestiv al nematodului entomopatogen *Steinernema feltias*, care, acționînd ca o seringă, inoculează bacteria în larvele insectelor sensibile. Bacteriile se înmulțesc în larve, pe care le omoară. Nematodul se hrănește cu bacterii, se înmulțește în carcasa insectei pe care nematodele progene infectate cu bacterii o părăsesc pentru a infecta alte larve normale.

### Insecticidele și bioacaricidele fungice

Peste 500 de specii de fungi *(Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes* și *Fungi Imperfecți)* sînt entomopatogeni și infectează insectele și acarienii în natură (Aronson, Beckman și Dunn, 1986). Existența lor a fost demonstrată experimental de Bassi (1834). Studiind infecția produsă de *Beauveria bassiana* (muscardina albă a viermilor de mătase) a sugerat posibilitatea utilizării microorganismelor în combaterea dăunătorilor.

Fungii entomopatogeni atacă insectele hipogee din solul umed sau din alte localizări similare ca temperatură și umiditate.

Numărul speciilor utilizate pentru biocontrolul dăunătorilor este limitat la *B. bassiana* pentru gîndacul de Colorado *(Leptinotarsa decemlineata)*, *Verticillium lecanii* pentru afide, *Hirsutella thompsonii* pentru acarieni și *Metarrhizium anisopliae*.

Studiul infecției este mai avansat în cazul *B. bassiana*, la care conidiile sau zoosporii aderă de suprafața cuticulei insectei sensibile și germinează. Hifa formată din tubul germinativ secretă o serie de enzime (chitinaze, lipaze, proteinaze) și formează o structură de tipul apresorilor, care îi facilitează pătrunderea și invadarea organismului insectei. Fungii se multiplică în hemocel, formînd celule levuriforme și determinînd moartea insectei. Aceasta poate surveni repede, cînd este produsă de toxine *(beauvericină, beauverolid, bassianolid, isarolid)* sau de alți metaboliți toxici, sau lent, cînd

este consecința multiplicării extensive a fungilor care determină distrugerea mecanică a organelor. După moartea gazdei, miceliul străbate din nou cuticula, de data aceasta de la interior spre exterior, pentru a forma noi unități reproductive.

Infecția este dispersată în natură prin mobilitatea larvelor, prin curenții de aer și apă, prin transferul pasiv asigurat de animale din sol și păsări, prin activități umane. Frecvent sînt declanșate epizootii care afectează considerabil populațiile de insecte sensibile.

Preparatele active: Beauverin și Vertalec (pentru afide), Mycon (bioacaricid) etc. conțin, în general, spori ($10^8 - 5 \times 10^9$/g) amestecați cu o pudră purtătoare protectoare. Sporii sînt obținuți prin culturi pe medii lichide, în laborator, sau pe cariopse de grîu sau porumb. Principalele avantaje decurg din caracterul de insecticide de contact, care nu trebuie ingerate. Nu determină rezistență și pot fi asociate cu anumite pesticide chimice. Un program de tratament bine administrat asigură o eficiență de-a lungul a trei anotimpuri.

*Dezavantajul major* este reprezentat de spectrul mai larg de activitate, decurgînd din faptul că atacă chiar genuri de insecte și acarieni îndepărtate din punct de vedere sistematic. Lipsa de nocivitate pentru unele insecte utile nu este demonstrată.

Alte dezavantaje derivă din:

1) acțiunea lentă, deoarece invazia corpului dăunătorilor prin creșterea hifelor necesită timp;

2) eficacitatea este în mare măsură condiționată de temperatură și umiditate (necesar 80%), de aceea insecticidele și acaricidele fungice sînt ideale pentru regiunile tropicale;

3) dispersarea în natură trebuie efectuată în perioade riguros alese;

4) sînt relativ greu de conservat și depozitat.

### Protozoarele

Cele mai multe protozoare produc infecții benigne ale insectelor dăunătoare. Cîteva au efect letal. Majoritatea sînt sporozoare *(Coccidia, Haplosporidia, Gregarinia* și *Microsporidia)*. Pramer și Alrabiai (1973) menționează că microsporidiile infectează peste 200 de specii de insecte.

Utilizarea protozoarelor în combaterea biologică este limitată datorită acțiunii lor lente și necesitatea de aplicare imediat înainte de dezvoltarea masivă a populațiilor de insecte. Unele dintre ele ca, de exemplu, *Thelohania hyphantriae*, au fost folosite cu rezultate bune în combaterea omizii păroase a dudului *(Hyphantria cunea)* (Weiser și Weber, 1957).

Evoluția infecției a fost studiată pentru *Malameba locustae*, care parazitează peste 40 de specii de lăcuste, ce se infectează ingerînd chiști. Aceștia germinează, dînd naștere unor amibe, care se localizează și se multiplică în celulele tubilor Malpighi și în epiteliul intestinal unde, final, se închistează. Procesul durează circa 16 zile. Efectul inițial este debilitant, insectele nu mănîncă, sînt mai puțin active; ulterior, prezintă o stare letargică, incapacitate de menținere a echilibrului, convulsii, urmate de moarte (Pramer și Al-Rabiai, 1973).

### Avantajele utilizării microorganismelor ca bioinsecticide

1) Microorganismele entomopatogene sînt produsele evoluției și au venit în contact cu insectele și cu mediul timp foarte îndelungat în comparație cu substanțele chimice neobișnuite, sintetizate de om. Cele mai multe au specificitate de gazdă, în sensul că afectează în exclusivitate anumite insecte dăunătoare, protejîndu-le pe cele utile (polenizatoare, prădători naturali etc.). Insecticidele microbiene testate pînă în prezent sînt virtual inofensive pentru vertebrate, ca și pentru alte forme de viață, diferite de dăunătorii-țintă. Cu toate acestea, fiecare produs trebuie tratat și controlat individual, deoarece în nici un sistem biologic potențial patogen, securitatea absolută nu poate fi garantată. Înainte de a utiliza un agent patogen trebuie luate în considerație cu prudență și cîntărite beneficiile ce pot fi obținute și riscurile potențiale (David, 1975; McPherson, 1988).

2) Nu eliberează substanțe toxice care ar putea intra în lanțul trofic sau care ar putea contamina sursele naturale de apă.

3) Fenomenele de rezistență sînt rare și apar cel mult foarte lent, probabil datorită persistenței limitate în mediu,

4) Unele dintre ele se multiplică și se transmit în populația de dăunători, asigurînd un control pe termen lung. Ele declanșează epizootii extinse, în cursul cărora agentul patogen circulă în populația sensibilă, determinînd boala cu un indice ridicat de mortalitate.

5) Sînt biodegradabile și nepoluante.

6) Pot fi utilizate în diferite combinații și asociate cu atractanți nutritivi (melasă etc.) pentru a stimula insectele să se hrănească pe suprafața frunzelor pe care au fost pulverizate.

7) În unele cazuri, efectul este foarte prompt: lezarea plantelor de către dăunătorii expuși la acțiunea *B. thuringiensis* încetează după cîteva minute de la ingerarea cristalelor de către insectă.

8) Costul este relativ redus și tehnologiile de producție sînt perfectibile.

9) Există perspectiva obținerii unor preparate cu eficiență mai mare și spectru de gazde mai extins, prin utilizarea tehnicilor de inginerie genetică.

### Dezavantajele și limitele pesticidelor microbiene

1) Activitatea bioinsecticidelor este condiționată de capacitatea lor de a stabili o nișă ecologică în mediul natural, de a supraviețui, de a competiționa cu alte microorganisme și de a nu fi foarte sensibile la variațiile de temperatură, umiditate și la acțiunea luminii solare.

2) Gradul mare de specificitate reprezintă un avantaj, dar, în același timp, și un inconvenient major, deoarece atît diferitele culturi, cît și pădurile sînt populate de un număr mare de dăunători. Spre exemplu, bumbacul are peste 10 dăunători diferiți, fiecare cu un comportament diferit, cu un ciclu de viață diferit și cu oscilații populaționale variate de la caz la caz (Kirschbaum, 1985). Or, nici un insecticid biologic unic nu poate competiționa cu a această diversitate de dăunători diferiți ai unei anumite culturi.

Cu excepția fungilor care se comportă ca insecticide de contact, celelalte bioinsecticide trebuie ingerate de insectele-dăunătoare. Deci, insectele trebuie să se hrănească obligatoriu cu țesuturi vegetale contaminate. Ca urmare, cele mai sensibile sînt insectele care consumă extensiv țesut foliar.

3) Insectele nu sînt deopotrivă de sensibile în toate fazele de dezvoltare, unele fiind chiar total rezistente. Din aceasta decurge necesitatea administrării, în anumite perioade de timp fixe, cînd larvele încep să se hrănească și înainte de a produce pagube culturilor (Okon și Hadar, 1987; Aronson, Beckman și Dunn, 1986). Se adaugă și alte dezavantaje ca:

4) Acțiunea unor factori de mediu (soare, temperatură, umiditate relativă etc.), care pot influența atît activitatea preparatului, cît și comportamentul insectei și capacitatea de a se infecta.

5) Riscul de îndepărtare de precipitații și, decurgînd din aceasta, nevoia de administrare repetată, cu consecințele negative de ordin economic.

6) În cazul administrării în mediile acvatice (pentru țînțari și simulii-de), nevoia de contaminare adecvată nu numai pentru a evita sedimentarea, ci și pentru a asigura plutirea într-o poziție adecvată biologiei larvei (respectiv, exact sub suprafața luciului de apă sau, după caz, ceva mai adînc).

Pe plan mondial, se apreciază că, în general, datorită profiturilor financiare mici aduse de bioindustria insecticidelor, acest tip de biotehnologie nu este valorificat, nestimulînd investiții și cercetări adecvate găsirii unor agenți noi sau unor forme perfecționate de administrare.

## Posibilități de ameliorare a activității insecticidelor biologice și virale

Cu toate avantajele lor evidente, acceptarea insecticidelor biologice și virale este limitată. Carlton (1990) apreciază că numai 0,5% din cheltuielile afectate pesticidelor revin produselor pe bază de *B. thuringiensis*.

Perspectivele cele mai importante sînt asigurate de tehnicile de inginerie genetică, după cum o demonstrează realizările obținute în ultimii ani. Ele vizează cîteva obiective majore ca:

1) obținerea unor tulpini cu activitate superioară față de principalii dăunători sensibili;

2) extinderea spectrului de gazde la insecte slab receptive sau rezistente;

3) mărirea duratei de persistență în cîmp;

4) obținerea, de plante transgenice capabile de autoapărare.

Tehnicile au la bază izolarea și clonarea genelor care codifică toxinele *(cry)* din celulele de *B. thuringiensis* și transferul lor la unele bacterii nesporulate, în special din sol, care se înmulțesc rapid. Dintre principalele rezultate obținute sînt de menționat următoarele:

— Clonarea genelor *cry* în celule de *Escherichia coli* (Schnepf și Whiteley, 1981), *Bacillus subtilis* (Klier și colab., 1982) și *B. megaterium* (Sekar și Carlton, 1985). Tehnica permite cumularea în aceeași bacterie a genelor *cry* provenite de la mai multe tulpini parentale cu specificități diferite (și mărirea spectrului de gazde), precum și amplificarea genelor și sinteza unor cantități *sporite* de toxină (Carlton, 1988).

— Includerea genelor specifice în noi sisteme de eliberare microbiene sau nemicrobiene (virusuri): în acest sens se urmărește scoaterea genelor de sub controlul sporogenezei, prin clonarea lor în prezența unui promotor constitutiv, și sinteza toxinei în toate etapele ciclului de dezvoltare, cu posibilitatea producerii toxinei în culturi continue.

— Legarea unei secvențe-„semnal"* ce asigură secreția din celulă a unei proteine toxice cu proprietăți fizice și de solubilitate diferite.

— Producerea de toxine cu activități noi și spectru mai larg sau sinteza simultană a mai multor toxine diferite, prin recombinarea genelor de la mai multe specii bacteriene.

**Crearea de plante transgenice** are la bază transferul genelor *cry* mediat de plasmida Ti de la *Agrobacterium tumefaciens* ca vehicul (vector) în protoplaștii celulelor vegetale (Fischof și colab., 1987; Vaeck și colab., 1988). După regenerarea peretelui celular și refacerea plantei-gazdă, celulele acesteia sintetizează suficientă toxină pentru a omorî insectele care atacă planta transgenică înainte ca aceasta să sufere leziuni ireversibile. Experimental s-a demonstrat rezistența plantelor de tutun și de tomate față de *Manduca sexta* și *Heliothis virescens*.

Integrarea genelor ce codifică toxina în genomul celulelor vegetale și obținerea de plante capabile de autoapărare are o deosebită importanță în cazul insectelor rezistente la pesticide chimice, mai ales în regiunile tropicale și subtropicale, în care, datorită climei, insectele au mai multe generații pe an și chimiorezistența se instalează foarte rapid (3 ani).

Watrud și colab. (1985) au transferat, cu ajutorul unei plasmide de la *Escherichia coli*, genele pentru Δ-endotoxină de la *B. thuringiensis* var. *kurstakii* la *P. fluorescens*. Bacteria reprogramată genetic sintetizează o toxină identică cu cea produsă de tulpina parentală. Utilizată pentru inocularea semințelor se dezvoltă în rizosfera plantelor și le protejează față de lepidopterele dăunătoare în condiții de seră, fără a afecta alte tipuri de insecte.

Dimock și colab. (1989) au transferat genele *cry* la o bacterie endofită *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontus*. Ea infectează semințele și/sau plantele în curs de dezvoltare și se multiplică în sistemul vascular al acestora, proeducînd o doză letală de toxină pentru insectele care atacă planta. Experimentele efectuate pe plante de porumb și orez s-au dovedit deosebit de reușite.

Întrucît bacteria endofită are un spectru larg de gazde, ca poate fi utilizată pentru inocularea unui număr mare de plante. De aceea, acest procedeu este mult mai avantajos decît utilizarea plantelor transgenice a căror realizare pune probleme specifice pentru fiecare specie de plantă în parte, iar activitatea față de dăunători este condiționată de menținerea și funcționarea genelor bacteriene într-un organism de tip eucariot. În plus, plantele transgenice, venind în contact cu mai multe generații de insecte, ar putea induce fenomene de rezistență.

Pe baza acestor date se admite că pesticidele microbiene vor avea în viitor un mare potențial de utilizare în orice program de combatere conceput inteligent și aplicat cu deosebită grijă.

## FITOTOXINELE DE NATURĂ BACTERIANĂ

Puțin cunoscute comparativ cu toxinele bacteriilor patogene pentru om și animale, fitotoxinele studiate pînă în prezent sînt produse, aproape în exclusivitate, de tulpini aparținînd diferitelor patovariante de *Pseudomonas syringae* (tabelul nr. 36).

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 271.

*Tabelul nr. 36*

**Principalele fitotoxine bacteriene**
(după Barzic, 1985)

| Bacteria | Planta-gazdă | Numărul compușilor activi | Denumirea toxinei |
|---|---|---|---|
| **PSEUDOMONAS** | | | |
| *P. syringae* pv *tabaci* | *Nicotiana tabacum*<br>*Phaseolus vulgrais* | 2 | Tabtoxina (2-serin)-tabtoxina |
| *P. syringae* pv *coronafaciens* | *Avena sativa*<br>*Zea mais* | 2 | Tabtoxina (2-serin)-tabtoxina |
| *P. syringae* pv *phaseolicola* | *Phaseolus vulgaris* | 2 | Phaseolotoxina (2-serin) phaseolotoxina |
| *P. syringae* pv *glycinea* | *Glycine max* | | Coronatina; acid coronafacic; acid coronamic |
| *P. syringae* pv *atropurpurea* | *Lolium multiflorum* | 1 | ($C_6H_{10}O_2N$) |
| | | 2 | Acid coronafacic-valină (N-coronafacil-valină) |
| *P. syringae pv syringae* | *Prunus* (*P. persica*; *P. amygdalus*)<br>*Pyrus*; *Zea mais* | 1 | Siringomicina |
| *P. syringae* pv *syringae* | *Citrus* | 1 | Siringotoxina |
| *P. syringae* pv *tagetis* | *Tagetes patula* | 1 | Tagetitoxina |
| *P. tolasii* | *Agaricus bisporus* | | |
| **XANTHOMONAS** | | | |
| *X. campestris* pv *malvacearum* | *Gossypium hirsutum* | 1 | Nedefinită |
| *X. campestris* pv *manihotis* | *Manihot esculenta* | 1 | Nedefinită |

Cele mai importante sînt:

**Tabtoxina**, identificată de Johnson și Murwin (1925), este produsă de *P. syringae pv. tabaci* și *P. syringae pv. coronafaciens.*

Este activă, în special, pe plante de tutun, fasole, ovăz și porumb.

Acțiunea sa toxică se realizează prin interferență cu activitatea glutamin sintetazei, pe care o inhibă ireversibil. Din această cauză, $NH_3$, substratul de acțiune al enzimei, se acumulează în plantă în doze de 40 de ori mai mari decît la plantele normale, determinînd cloroză și, final, necroza țesuturilor vegetale. După Turner și Debbage (1982), acțiunea ar fi mai complexă în sensul că pe lîngă blocarea ciclului $N_2$ în plante ar inhiba ribulozo-1-5-difosfat-carboxilaza, precum și enzimele fotosintezei.

Se prezintă sub două variante ca structură chimică: *L-treonin-tabtoxinin-β-lactam* și *L-serin-tabtoxinin-β-lactam(2-serin-tabtoxina).*

**Phaseolotoxina** este produsă de *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola.*

Este activă pe plantele de fasole.

Afectează metabolismul argininei, pe calea ornitin-carbamil-transferazei. Reducerea concentrației argininei în frunze determină reducerea sintezei proteinelor prin deficitul aminoacidului respectiv. O primă consecință este diminuarea sintezei enzimelor care participă la formarea clorofilei. Paralel se mai constată o perturbare a metabolismului acizilor grași și inhibarea dezvoltării celulelor în culturi vegetale.

Experimental s-a demonstrat că 10 ng de toxină pură determină o acumulare de 0,75 mg de ornitină/g de țesut vegetal (normal 3 μg/g). Ca rezultat al acestor modificări apar fenomene caracteristice de cloroză. De asemenea, în cursul infecțiilor produse de bacteria toxigenă, concentrația L-ornitinei în frunze depășește de 100 de ori pe cea din frunzele sănătoase.

Structura chimică este necunoscută. Au fost propuse două variante: prima corespunde unei structuri tripeptidice (alanină, ornitină, homoarginină), asociată cu o moleculă de fosfat, legat, la rîndul său, de sulfat; a doua (N -fosfosulfamil)-ornitil-alanil-homoarginină (Barzic, 1985) (fig. 211).

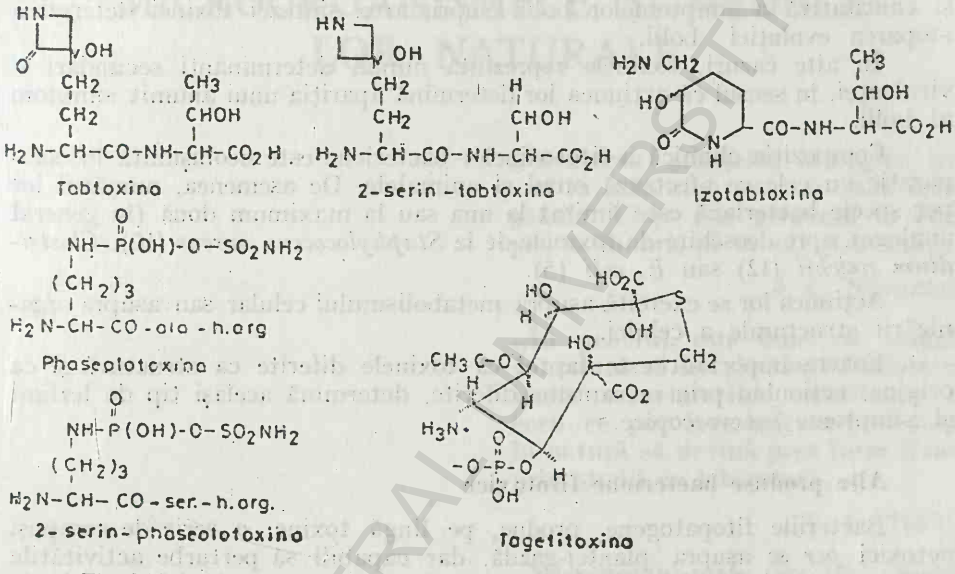



Fig. 211. — Formule chimice ale unor fitotoxine bacteriene (după Barzic, 1985).

**Tagetitoxina** este produsă de *P. syringae pv. tagetis.*

Produce leziuni de cloroză apicală tipică pe frunzele și pețiolii de la *Pagetes patula* L. Toxina determină modificări complexe plantei-gazdă, care includ modificări profunde în structura cloroplastelor, determinînd dezorganizarea totală a acestora. Se constată o dispariție a ribosomilor și apariția unor globule lipidice.

Mitchell și Hart (1983) sugerează, pe baza analizei chimice și RMN, formula: $C_{11}H_{18}NO_{13}PS$ cu configurație ciclică și g.m. 435 dal.

**Siringomicina și siringotoxina.** Produse de *P. syringae pv. syringae*, cele două toxine acționează pe plante diferite.

Siringomicina este activă la piersic *(Prunus persica)*, migdal *(P. amigdalus)*, păr *(Pyrus communis)* și la porumb *(Zea mais)*.

Ambele toxine afectează organizarea membranelor celulei vegetale. Dozele subletale induc aberații structurale, proliferări mitocondriale asociate cu structura și metabolismul mitocondrial. Dozele letale induc dezintegrări rapide și intense într-un timp foarte scurt (~ 10 minute).

Structura chimică, probabil peptidică, este încă nedefinită.

Siringomicina conține: acid aspartic, serină, glicocol, alanină, valină, acid D-glutamic, D-lizină și D-fenil alanină.

Siringotoxina ar conține: treonină, serină, glicocol și ornitină în proporții echimoleculare.

### Particularitățile fitotoxinelor bacteriene

Ca și în cazul patogenilor pentru animale, unele fitotoxine bacteriene reprezintă determinanți principali ai bolii: inocularea plantelor sănătoase cu bacterii vii sau cu soluții toxice are ca rezultat exprimarea calitativă și cantitativă a simptomelor bolii. Suprimarea sintezei toxinei determină stoparea evoluției bolii.

În alte cazuri, toxinele reprezintă numai determinanți secundari ai virulenței, în sensul că acțiunea lor determină apariția unui anumit simptom al bolii.

Compoziția chimică a fitotoxinelor bacteriene este neobișnuită în comparație cu cele ce afectează omul și animalele. De asemenea, numărul lor per specie bacteriană este limitat la una sau la maximum două (în general analoge), spre deosebire de toxinele de la *Staphylococcus aureus* (10), *Clostridium welchii* (12) sau *E. coli* (5).

Acțiunea lor se exercită asupra metabolismului celular sau asupra organizării structurale a celulei.

Foarte important este faptul că toxinele diferite ca structură și ca origine, acționînd prin mecanisme diferite, determină același tip de leziuni și simptome macroscopice.

### Alte produse bacteriene fitotoxice

Bacteriile fitopatogene produc, pe lîngă toxine, o serie de compuși netoxici *per se* asupra plantei-gazdă, dar capabili să perturbe activitățile celulare acționînd în doze relativ mari fără să omoare. Astfel, o serie de bacterii produc substanțe de tip glicopeptidic sau poliozidic, cu efecte negative asupra plantei-gazdă. Între acestea, cele mai cunoscute sînt:

1) **Erwinia amylovora,** care produce *amilovorina,* poliozid cu g.m. 165 kdal, conținînd 98% galactoză și 0,37% proteine;

2) **Clavibacter** (fost *Corynebacterium)* **michiganense** subsp. **insidiosum** și subspeciile **michiganense** și **sepedonicum**, producînd, de asemenea, glicopeptide, cu g.m. variind între 35 și $5 \times 10^3$ kdal.

3) **Xanthomonas campestris** produce glicopeptide și un poliozid.

Toate aceste substanțe, diferite ca origine și particularități biochimice, sînt asociate cu veștejirea plantelor-gazdă contaminate. Efectul lor ar fi în cea mai mare parte nespecific și de ordin mecanic și ar consta, în principal, într-o perturbare a circulației apei în plantă, datorită creșterii vîscozității lichidului vascular și reducerii considerabile a turgescenței celulelor. O dovadă o constituie faptul că efectul lor poate fi reprodus cu ajutorul unei soluții de dextran cu g.m. $2 \times 10^6$.

În sfîrșit, unele enzime cu acțiune directă asupra structurilor celulare (celulaze, pectinaze, enzime ligninolitice), precum și unii acizi organici pot determina efecte ușor de confundat cu cele ale fitotoxinelor bacteriene.

PARTEA A DOUA

# MICROORGANISMELE ȘI MEDIILE LOR NATURALE

„Învățarea științelor biologice numai în laborator este un abuz neîngăduit. Viața este prezentă în cîmpie, în lacuri, pe munți și în mări...

J. C. NEEDHAM

„În general, este bine ca studiile în natură să fie efectuate înainte ca ideile cercetătorilor referitoare la ceea ce pot face microorganismele în natură să devină prea ferm fixate prin studii de laborator".

T. D. BROCK

„Microorganismele au un spectru mai larg de potențialități fiziologice decît toate celelalte organisme la un loc. Ele reprezintă forme de viață care pot persista în natură, deoarece ocupă nișe ecologice foarte diferite".

D. B. VAN NIEL

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# ECOSFERA

**Biosfera** reprezintă totalitatea organismelor vii de pe Pămînt și din mediile abiotice înconjurătoare.

Termenul a fost propus de Suess (1875) și adoptat de Vernadsky, inițial într-o lucrare în limba rusă (1920) și, ulterior (1929), în limba franceză. Colelamont (1958) a propus termenul de *ecosferă*, considerat de ecologi ca mai adecvat, deoarece evidențiază mai pregnant unitatea dintre comunitățile de organisme (biocenoze) și mediul abiotic. Denumirea de ecosferă este justificată și prin faptul că organismele vii afectează profund compoziția și structura planetei, în special prin modificările biogeochimice induse de microorganisme.

Ca mediu global, locuit de organismele vii, ecosfera cuprinde trei compartimente majore: *atmo-ecosfera*, *hidro-ecosfera* și *lito-ecosfera*, fiecare dintre ele alcătuit dintr-un număr enorm de habitate.

Figura 212, după Hutchinson (1970), prezintă limitele de extindere pe verticală a biosferei, indicînd, în cazul regiunilor terestre, înălțimea maximă de dezvoltare a plantelor superioare ($\sim$ 6 200 m în Himalaya unde, pe lîngă temperaturile scăzute, absența apei lichide și presiunea scăzută a $CO_2$, mai puțin de jumătate din cea înregistrată la nivelul mării, fac imposibilă viața plantelor). În zona eoliană, situată dincolo de această înălțime, viața animală este limitată la cîteva specii de păianjeni. În această zonă mai pot fi găsite grăuncioare de polen și diferite particule organice aduse de vînt.

Biosfera are o formă neregulată și este înconjurată de o *parabiosferă*, cu limite nedefinite. Singurele sisteme biologice care pot depăși limitele biosferei, pentru a fi prezente în parabiosferă, ca forme de rezistență latente, sînt microorganismele (Hutchinson, 1970). În mod artificial, diferitele nave spațiale care călătoresc în spațiu, depășind limitele biosferei normale, pot fi considerate ca mici volume artificiale de biosferă proiectate temporar în parabiosferă.

**Adîncimea biosferei terestre.** Datele referitoare la limita inferioară a vieții sub suprafața scoarței terestre sînt puțin numeroase, vechi și obținute cu tehnici puțin fiabile.

Astfel, ZoBell (1958) a găsit bacterii sulfat-reducătoare în apa și carotele * prelevate de la adîncimea de 3 700 m, în asociere cu zăcăminte de țiței și sulf. La acest nivel, temperatura *in situ* este de 95°C, iar presiunea

---

* Carote — probe de rocă sau de sediment de formă cilindrică, recoltate cu un dispozitiv special pentru analiză.

de 400 atm. Bacteriile izolate au fost cultivate în laborator pe medii de cultură îmbogățite, la temperatura de 104°C și 1 000 atm.

În mod asemănător, Kuznetsov (1963) a izolat din apa de strat și din carote bacterii sulfat-reducătoare termofile și oxidante ale hidrocarburilor, iar Olson și colab. (1981) au evidențiat prezența bacteriilor metanogene în ape de strat situate la adîncimea de 1 800 m.

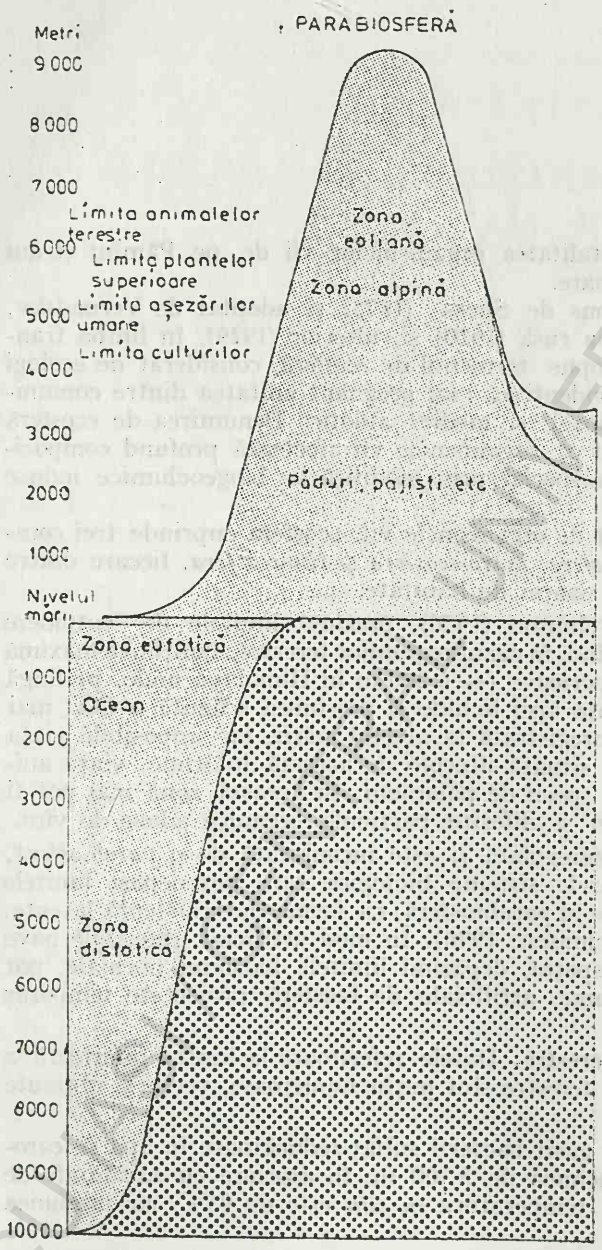



Fig. 212. — Limitele diferitelor zone ale biosferei pe verticală (după Hutchinson, 1970).

Rezultatele menționate sugerează, după Ghiorse și Williams (1989) (exceptînd evident riscul contaminărilor), posibilitatea existenței microorganismelor viabile la adîncimea de 4 000 m cu condiția existenței apei, a nutrienților și a unor structuri poroase.

În lipsa unor date contrare, ei nu exclud posibilitatea prezenței micro-organismelor în subsol chiar la adîncimi mai mari, în teritori în care temperatura nu depășește 120°C, considerată de mulți autori ca limita extremă pentru supraviețuirea microorganismelor (Trent și colab., 1984).

Teoretic, în subsol ar putea exista medii caldoactive cu temperaturi și presiuni ridicate similare izvoarelor hidrotermale din fundul oceanelor. Dificultatea rezidă în faptul că tehnologiile de forare care țintesc spre orizontul de 10 000 m sînt abia pe cale de dezvoltare.

După Ghiorse și Williams (1989), stabilirea limitei biosferei terestre are importante consecințe teoretice și practice privind: 1) geneza zăcămintelor de sulf; 2) geneza, degradarea și recuperarea țițeiului; 3) utilizarea ferobacteriilor și a bacte-

riilor sulfoxidante în tehologii de minerit subteran; 4) utilizarea acviferelor de la mare profunzim

**Adîncimea biosferei acvatice.** *În mediul acvatic*, zona eufotică este sediulu activităii organismelor fotosintetizante care asigură productivitatea primară a lacurilor, rîurilor, mărilor și oceanelor. Avînd, în funcție de condițiile locale, dimensiuni variabile de la cîțiva cm (în cazul unor bălți) pînă la 100 m, în regiunile de larg al oceanelor, această regiune este sediul vegetalelor planctonice, care asigură, în cea mai mare parte, sursa de hrană a animalelor. Cele mai multe au o densitate puțin mai mare decît apa de mare astfel încît, în condiții de acalmie, se depun lent cu viteze care țin de forma, mărimea și densitatea lor. În timp ce se depun, multe se divid și populația planctonică din regiunile superioare este reînnoită de curenții de „upwelling" (Hutchinson, 1970).

Viața continuă și în zona disfotică și chiar afotică, bogată în depuneri de substanță organică neanimată (organisme moarte, schelete, resturi fecale etc.) unde pot avea loc, ca și în celelalte medii, procese microbiene de mineralizare și de redare a constituenților acestora ciclului biologic al elementelor.

Adîncimea maximă la care au fost evidențiate microorganisme active este de aproximativ 11 100 m.

Admițînd că apele oceanice permit existența unor forme de viață la toate adîncimile și presupunînd convențional o grosime de 38 m pentru biosfera continentală efectivă, Jannasch și Taylor (1984) consideră că 99% din biosfera întregului glob corespunde apelor marine. Din aceasta, peste 62% au temperatura de 3°C și o presiune mai mare de 100 atm.

Sub raportul compoziției chimice, biosfera este dominată cantitativ de N, O, C și H, cărora li se adaugă alte elemente ca, de exemplu, Ca, K, Si, Mg, S, Al, P, Cl, Fe, Mn, Na etc.

Ecosfera asigură condițiile esențiale pentru dezvoltarea organismelor vii: 1) existența apei în stare lichidă, în cantități adecvate; 2) prezența unei surse de energie; 3) existența unor interfețe între diferitele stări (lichide, solide și gazoase) ale materiei.

Menținerea echilibrului dinamic al biosferei este asigurată de aportul de energie de la soare și de modificările ciclice ale elementelor esențiale pentru întreținerea vieții (în primul rînd C, O, N, H, S, P).

În acest context, plantele verzi, în regiunile terestre, și microorganismele (alge, cianobacterii și bacterii fototrofe) fotosintetizante, în mediile acvatice, captează energia solară, utilizînd-o pentru a sintetiza o mare diversitate de molecule organice cu o arhitectură precisă și frecvent specifică. Acțiunea lor este optimă în regiunile iluminate ale ecosferei la suprafața solului și în stratul superficial gros de cîțiva milimetri și în zona eufotică (cu dimensiuni variabile) din mediile acvatice (lacuri, rîuri, oceane etc.).

Raportată la suprafața Pămîntului, biosfera este foarte redusă. Pe bază de calcul, se apreciază că în medie un $cm^2$ de suprafață terestră poartă 580 mg de biosferă, respectiv, după expresia lui Deevey Jr. (1970), „ceva mai mult decît o tabletă de aspirină".

Rezultatul global geochimic al fotosintezei este de a produce o parte a biosferei mult mai oxidată, respectiv atmosfera și mediile acvatice, în care este dizolvat oxigenul, și o parte mult mai redusă reprezentată de corpul diferitelor organisme și de produșii descompunerilor organice din litieră, sol și sedimente acvatice (Hutchinson, 1970).

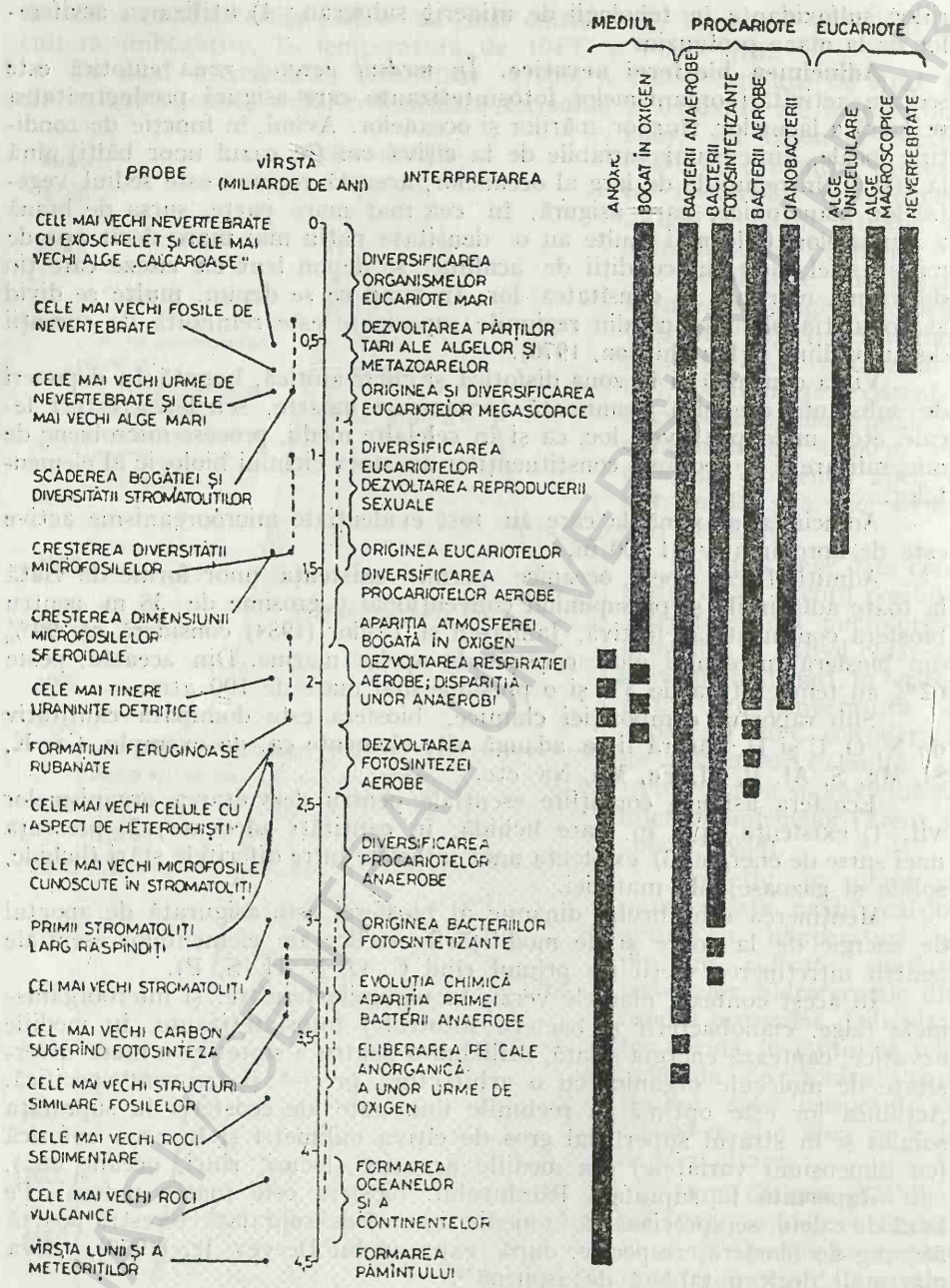



Fig. 2.13. — Evenimentele majore din Precambrian prezentate în ordine cronologică, pe baza datelor furnizate de prezența fosilelor, a geologiei substraturilor anorganice și a studiilor de biochimie comparată a organismelor moderne (după Schopf, 1978).

**Formarea biosferei** este direct dependentă de evoluția biologică. Pe baza datelor furnizate de prezența fosilelor și a studiilor de biochimie comparată, ar avea o vechime de $\sim$ 3,5 miliarde de ani (fig. 213). Deși natura primelor organisme apărute este obiectul a numeroase controverse, esențial este faptul că microorganismele și, în special, bacteriile au jucat un rol esențial în modelarea parametrilor esențiali ai perioadei primitive din evoluția Terrei.

Transformarea atmosferei primitive a Pământului a necesitat colonizarea lui efectivă de către organismele procariote și diversificarea lor într-o gamă largă de tipuri, fapt atestat de prezența în mai multe regiuni a unei mari varietăți de bacterii fosilizate, diferite ca formă și mărime în depozitele provenite din Precambrian.

Reprezentînd formula minimală, dar suficientă pentru nivelul de organizare celulară (Palade, 1967), emergența celulelor bacteriene a marcat un eveniment crucial în apariția și evoluția biosferei, deoarece a făcut posibilă replicarea, i-a îmbunătățit eficiența, a întemeiat viața și, prin aceasta, a amorsat procesul evoluției. De aceea, prima perioadă din evoluția biosferei a fost descrisă ca „era Procariotelor".

Importanța deosebită a procariotelor asupra compoziției chimice a ecosferei este sugerată și de datele lui Brock și Madigan (1991), referitoare la perioada actuală. După estimările lor, activitatea globală a bacteriilor ar avea drept consecință următoarele influențe majore asupra compoziției atmosferei:

1, eliberarea de metan prin acțiunea archebacteriilor = 180 Tg/an; (1 Tg = $10^{12}$ g) (= 58%);
2, eliberarea de $H_2S$ de către bacterii și archebacterii = 37 Tg/an;
3, eliberarea de $NH_3$ de către bacterii = 75 Tg/an;
4, eliberarea de $N_2$ (de către bacteriile denitrificatoare = 210 Tg/an);
5, fixarea de $N_2$ atmosferic de către bacterii și archebacterii = 240 Tg/an.

Pentru comparație, Trüper (1992) menționează că fixarea industrială de $N_2$ reprezintă 36 Tg/an, iar eliberarea abiogenă de metan este de aproximativ 130 Tg/an (= 42%).

# ATMO-ECOSFERA CA HABITAT ȘI MEDIU MAJOR PENTRU RĂSPÎNDIREA MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ

**„Atmosfera pămîntului este invadată de microorganisme: multe sînt omorîte prin expunerea la acțiunea elementelor acesteia; unele supraviețuiesc și sînt inofensive pentru formele de viață mai evoluate; altele răspîndesc boli ale plantelor de la o cultură la alta sau de-a lungul continentelor; în sfîrșit, altele răspîndesc boli ale omului și animalelor".**

P. H. GREGORY

Atmosfera reprezintă stratul de înveliș gazos, fără limită superioară precisă, care înconjură Pămîntul.

Conține 79% $N_2$, 21% $O_2$, 0,032% $CO_2$, cărora li se pot adăuga picături de apă lichidă, cristale de gheață, particule de praf etc.

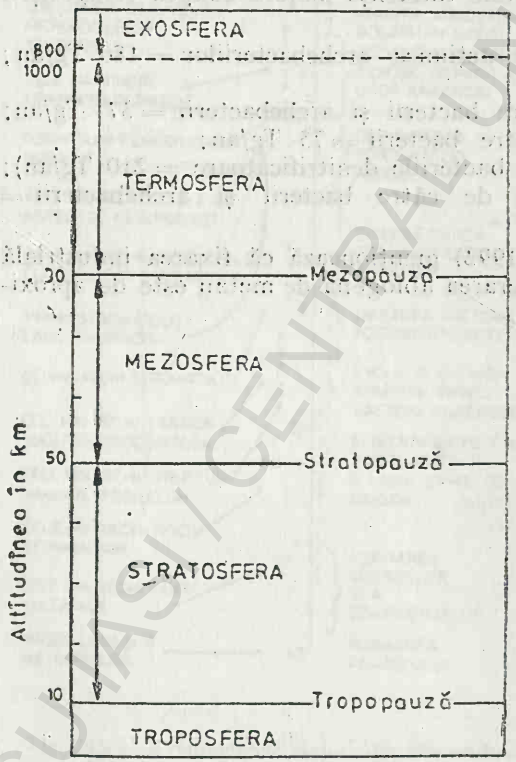



Fig. 214. — Reprezentarea schematică a structurii atmo-ecosferei pe verticală.

Pe baza temperaturilor minime și maxime, atmosfera poate fi divizată în mai multe zone concentrice, separate de zone de tranziție („pauze"), cu importanță pentru influențele asupra biologiei microorganismelor (fig. 214).

**Troposfera** este stratul inferior al atmosferei, aflat în contact direct cu Pămîntul, la interfața cu litosfera și hidrosfera. Cuprinde ~ 80% din masa totală de aer și are o grosime medie de 10 — 11 km (5 km la poli și 18 km la ecuator). Este sediul formării norilor, a precipitațiilor și a curenților de aer. Practic, troposfera reprezintă limita de extindere a ecosferei, deoarece interschimbul dintre ea cu zonele superioare este extrem de redus.

**Stratosfera** este o zonă cu o grosime de ~30 km (după Lacey, 1979, de 50 km), separată de troposferă prin zona de tranziție numită *tropopauză*. În stratosferă au loc deplasări orizontale ale aerului cu direcția vest — est

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în stratul inferior și est — vest în cel superior. Are o temperatură sensibil constantă.

**Stratopauza** reprezintă zona concentrației maxime de ozon, care protejează Pământul de o iradiere excesivă cu radiații UV. Reducerea grosimii acestui strat sub acțiunea unor practici umane (ca, de exemplu, utilizarea excesivă a compușilor pe bază de fluorocarbon) sau sub acțiunea microorganismelor (producerea de $N_2O$ prin denitrificare, în cazul administrării de fertilizatori în exces) are efecte negative asupra climei Planetei.

**Mezosfera** are o înălțime de ~ 85 km și prezintă variații mari de temperatură (de la + 20 — + 30°C în zona inferioară la — 100°C în cea superioară). Este o zonă în care predomină $N_2$ și $O_2$.

**Termosfera** sau ionosfera corespunde ansamblului regiunilor înalte, cu limita teoretică de 800—1 000 km, conținînd gaze rarefiate, puternic ionizate. Sub acțiunea radiațiilor solare, temperatura crește pînă la 250°C — 1 000°C. Este zona în care predomină oxigenul atomic (fig. 215).

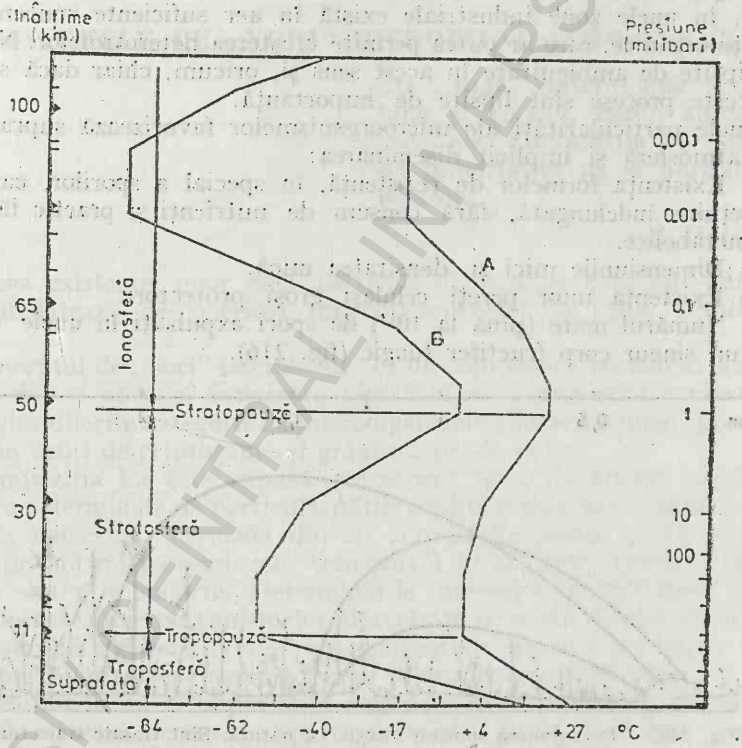



Fig. 215. — Reprezentarea schematică a diviziunilor atmosferei cu indicarea gradientelor de presiune și de temperatură. Cele două curbe (A și B) indică modificările sezoniere ale temperaturii (după Rumney 1968).

**Exosfera**, reprezentînd cea mai înaltă regiune a atmosferei, se extinde în spațiul interplanetar dincolo de înălțimea de 1 000 m. Este o regiune izotermică, în care are loc disiparea atmosferei terestre și în care predomină heliul.

# ATMOSFERA CA HABITAT PENTRU MICROORGANISME

Atmosfera nu este un mediu favorabil pentru creșterea și multiplicarea microorganismelor. Ele găsesc cel mult condiții de supraviețuire temporară, cel mai adesea în stare latentă (ca spori). Unele mor rapid, altele supraviețuiesc perioade mai îndelungate de timp. De aceea, ideea mai veche a existenței unui aeroplancton specific, permanent, a fost abandonată.

Cu toate acestea, un număr mare de microorganisme provenite din regiunile terestre și acvatice sînt prezente în troposfera inferioară, în care datorită curenților de aer există condiții favorabile pentru dispersarea lor. Teoretic, anumite localizări temporare în troposferă pot furniza habitate pentru microorganisme. Astfel, după Atlas și Bartha (1987), unele zone cu straturi dense de nori favorizează, prin umiditatea lor, dezvoltarea microorganismelor care pot beneficia de intensitatea adecvată a luminii, de prezența $CO_2$ și a nutrienților minerali din nucleii de condensare. De asemenea, teoretic, în unele zone industriale există în aer suficiente concentrații de substanțe organice, care ar putea permite creșterea heterotrofelor. Nu există probe lipsite de ambiguitate în acest sens și, oricum, chiar dacă sînt posibile, aceste procese sînt lipsite de importanță.

Unele particularități ale microorganismelor favorizează supraviețuirea lor în atmosferă și implicit diseminarea:

1) Existența formelor de rezistență, în special a sporilor, capabili de supraviețuire îndelungată, fără consum de nutrienți și practic fără activități metabolice.

2) Dimensiunile mici și densitatea mică.

3) Existența unor pereți celulari groși protectori.

4) Numărul mare (pînă la $10^{12}$) de spori expulzați în unele cazuri în aer de un singur corp fructifer fungic (fig. 216).

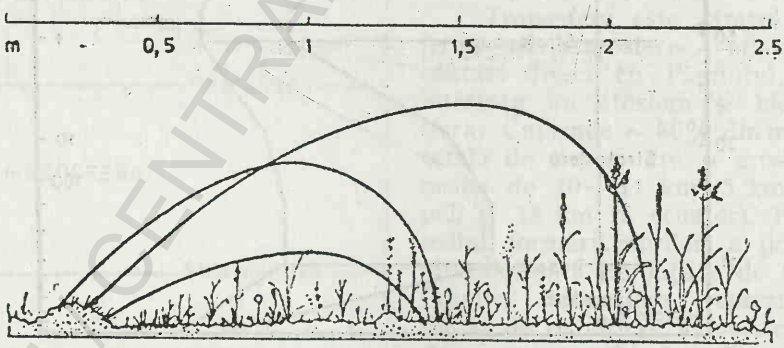



Fig. 216. — Diseminarea sporilor fungici în natură. Sînt trasate traiectoriile a trei spori de *Pilobolus longipes* proiectați la distanță după ruperea sporangelui (după Brock, 1963).

5) Existența pigmenților protectori față de radiațiile solare. Experimental s-a demonstrat că în timp ce tulpinile sălbatice de *Micrococcus luteus* (care conțin pigment galben) sînt rezistente la lumină, mutantele incolore sînt omorîte printr-un proces de fotooxidare care necesită $O_2$. În mod asemănător, mutantele de *Halobacterium salinarium* fără caroten sînt mult mai sensibile decît celulele pigmentate.

6) Prezența unor forme aerodinamice, care favorizează circulația laterală a vacuolelor cu gaze etc.

Există o serie de condiții care limitează supraviețuirea și dispersarea microorganismelor în atmosferă, ca, de exemplu:

1) cantitatea redusă de apă;

2) scăderea progresivă a temperaturii cu înălțimea sub limita de toleranță a microorganismelor (—43°C → —83°C în stratul superior al troposferei);

3) concentrația mică de C organic pentru heterotrofe;

4) scăderea progresivă a $O_2$, incompatibilă cu viața microorganismelor aerobe;

5) efectul mutagen sau letal al radiațiilor etc.

Cu toate aceste limite, atmosfera este considerată ca fiind mediul natural cu importanță majoră în răspîndirea microorganismelor, între diferitele ecosisteme din hidro- sau litoecosferă.

## SISTEMELE DE „NORI" MICROBIENI ATMOSFERICI

**„O „supă" microbiană sealdă, la bine și la rău, omul, animalele și recoltele. Compoziția ei este la fel de importantă ca și puritatea apei potabile".**

P. H. GREGORY

Ideea existenței unor mici particule dăunătoare care sînt purtate de vînt, antedatează descoperirea microorganismelor de către Leeuwenhoek (1675).

Conceptul de „nori" microbieni, ca un component normal al atmosferei externe, dar și al celei interioare (din încăperi), este relativ nou. Ei sînt formați din diferite categorii de microorganisme (bacterii, fungi, protozoare), dar și din spori de criptogame și grăuncioare de polen.

Compoziția lor este expusă permanent unor modificări cantitative și calitative determinate de particularitățile mediului fizic local, climă, anotimp, vegetația adiacentă, perioada din zi, activitățile umane și ale animalelor, aportul de noi microorganisme, transportul la distanță, pierdere prin sedimentare sau prin moarte. Determinările numerice și calitative se fac fie prin examinarea microorganismelor dezvoltate pe medii de cultură solidificate expuse aerului atmosferic, fie prin dispozitive speciale prevăzute cu filtre de membrană, bazate pe aspirația unui volum cunoscut de aer.

Rezultatele au o importanță relativă. Atît gravitația, cît și curenții de aer favorizează depunerea particulelor mai grele. Cele mai mici și mai ușoare sînt subestimate. În plus, toate metodele de cultivare au un grad de selectivitate, în sensul că nu pot evidenția toate tipurile de microorganisme prezente. Pentru straturile superioare ale atmosferei se folosesc instrumente perfecționate de tipul filtrelor adaptabile la avioane (fig. 217).

**Densitatea pe verticală.** Fulton (1966) a urmărit prezența sporilor fungici proveniți de la sol și din covorul vegetal prin aspirația aerului în filtre cu spumă de gelatină, simultan la altitudinile de 690, 1 600 și 3 127 m, într-o regiune din Texas, expusă influențelor oceanului. A constatat o scădere progresivă a densității sporilor pe verticală, în raport cu înălțimea,

și, în același timp, o anumită corelație cu perioada de zi și respectiv cea de noapte (tabelul nr. 37).

Aceste variații pot fi atribuite, pe de o parte, ritmului circadian al mecanismelor de eliberare a sporilor și, pe de alta, modificărilor zilnice ale factorilor meteorologici. Fulton (1966) a constatat și unele deosebiri calitative evidente pe timp frumos.

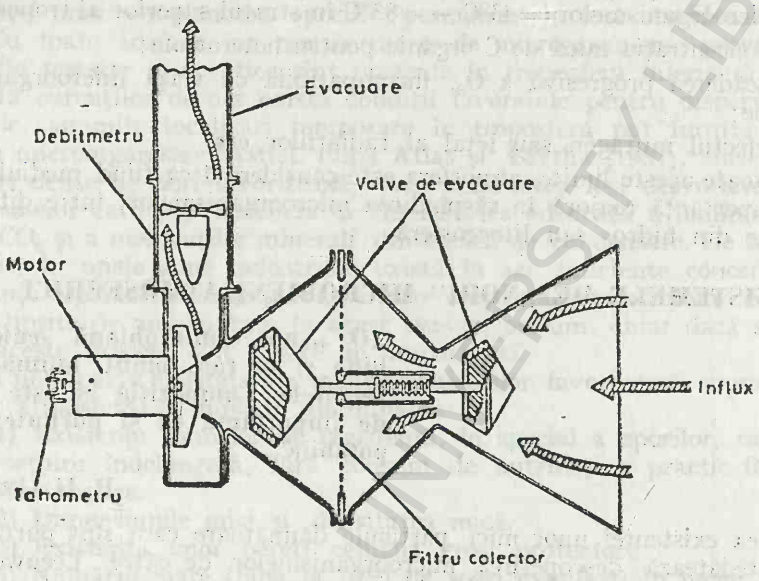



Fig. 217. — Reprezentarea schematică a unui dispozitiv de recoltare a probelor de aer din atmosfera superioară, utilizat în programul NASA. Săgețile indică direcția de circulație a aerului, iar linia întreruptă, filtrul colector (după Lidwell, 1967).

„Norii" microbieni „de zi" conțin spori de *Cladosporium*, mulți spori deshidratați de *Fungi Imperfecti*, uredospori ai mucegaiurilor de putregai etc. Lor li se adaugă cantități mari de polen de la arbori, plante ierboase sau buruieni, în funcție de anotimp. Noaptea, sporii „de zi" dispar și sînt înlocuiți, uneori, de cantități enorme de spori de *Sporobolomyces* și *Tilletiopsis*.

*Tabelul nr. 37*

**Variațiile densității microorganismelor viabile/m³ de aer (bacterii și fungi), în raport cu înălțimea** (după Fulton, 1966)

| Orele | Înălțimea (m) deasupra solului | | |
|---|---|---|---|
| | 690 | 1 600 | 3 127 |
| 0— 6 | 75 | 49 | 17 |
| 6—12 | 45 | 25 | 24 |
| 12—18 | 233 | 67 | 34 |
| 18—24 | 193 | 72 | 37 |

de basidiospori de ciuperci cu pălărie și sporii unor tipuri de actinomicete. Cînd se face ziuă, sporii de noapte dispar, fiind înlocuiți treptat cu cei de zi.

La înălțimea de 690 m, sporii bacterieni și fungici sînt în număr egal, în timp ce la 1 600 și 3 127 m, 90% din sporii capturați sînt bacterieni.

## MECANISME DE DISEMINARE A FUNGILOR

Sporii fungici se pot desprinde de țesutul parental prin două mecanisme majore, cu importanță esențială pentru înțelegerea modului de transmitere a bolilor produse de plante (Ingold, 1971; Meredith, 1973):

I. **Eliberarea pasivă** se realizează sub influența unor surse de energie externă (curenți de apă, impactul picăturilor de ploaie, deplasarea animalelor etc.), de asemenea, prin două mecanisme majore:

1) *Prin intermediul curenților de aer*, ca mod de dispersare caracteristic fungilor la care sporii maturi sînt deshidratați, astfel încît pot fi eliberați ca o pulbere fină uscată, chiar sub acțiunea unor adieri ale vîntului. A fost descris la *Penicillium* sp., *Monilia sitophila*, *Rhizopus nigricans*, *Botrytis cinerea* etc.

Viteza minimă eficientă pentru diseminare este variabilă după specia fungică: de la $< 1{,}6$ km/oră la *Botrytis cinerea* pînă la 5,6 km/oră la *Cunninghamella* sp.; *Phytophtora infestans* rezistă și la 12 km/oră. Relația directă dintre eficiența dispersării și viteza curentului de aer a fost demonstrată experimental prin expunerea unei probe de fîn contaminate la viteze diferite într-un tunel experimental: după 30 minute, la o viteză de 1,6 km/oră, sînt dispersați 50 de milioane de spori. După alte 30 minute, la viteza de 16,7 km/oră sînt eliberați alte 55 de milioane de spori.

2) *Prin intermediul stropilor de ploaie.* Mecanismul, important în special în cazul sporilor menținuți pe suprafața frunzelor prin intermediul unor polizaharide extracelulare, a fost descris și studiat în cazul actinomicetelor, al unor fungi (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium* sp., *Microascus* sp., *Phytophtora* sp., *Venturia inaequalis* etc.). Eliberarea se realizează prin umezire și suspendarea lor în picăturile de apă. Picăturile de ploaie proiectate pe o peliculă fină de apă sînt pulverizate în 100—5 000 de picături mai mici, care sînt dispersate de jur împrejurul zonei de impact. Dimensiunile lor variază între 5 și 2 400 μm (cele mai mici fiind cele mai numeroase), iar distanța la care sînt proiectate este variabilă (fig. 218). Numărul maxim de picături pulverizate este atins după 0,0035 secunde de la impact.

După Gregory (1971), jumătate din ele ajung la mai puțin de 21 cm, unele ating 125 cm, iar pe verticală pot ajunge la 40 cm deasupra suprafeței. Numărul total al picăturilor produse și al sporilor purtați crește pe măsură ce mărimea și viteza picăturilor incidente cresc și grosimea peliculei de apă scade.

Spre deosebire de răspîndirea directă prin aer, în care sporii dispersați se fixează cel mai adesea stabil pe diferite substraturi, sporii proiectați prin picăturile de ploaie sînt împroșcați și reîmproșcați înainte de a se fixa.

II. **Eliberarea activă sau violentă** utilizează potențialul energetic generat în însăși structura fungilor pentru a învinge forțele de adeziune care asigură menținerea sporilor asociați cu structurile parentale și s-ar realiza

după Lacey (1979), după cel puțin 18 mecanisme diferite. Dintre acestea, menționăm:

1) Mișcările de răsucire higroscopică ale regiunii terminale a conidioforilor, descrise la un număr important de fungi, ca rezultat al uscării aerului apropiat de aparatul conidial, urmate de dispersarea conidiilor în diferite direcții ale spațiului. Eficiența mecanismului este în funcție de rapiditatea și intensitatea uscării lor, care, la rîndul lor, sînt influențate de modificările mediului ambiant.

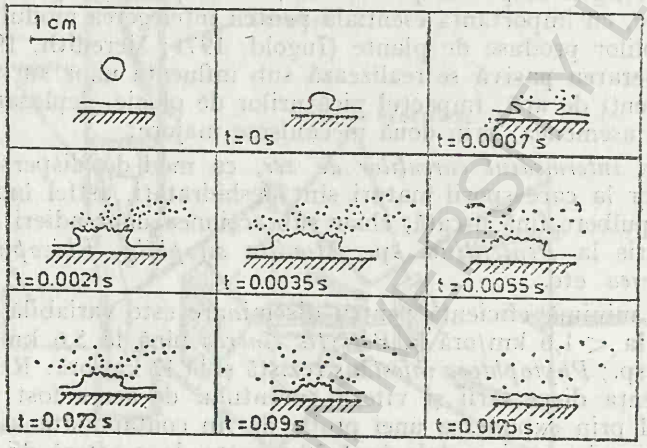



Fig. 218. — Efectul de împrăștiere a microorganismelor sub impactul unor picături de apă (cu diametrul de 5 mm), proiectate cu o viteză de 440 cm/secundă, pe o peliculă fină de lichid. Cifrele indică timpul în secunde din momentul impactului (după Gregory, 1973).

2) Eliberarea prin creșterea presiunii de vapori descrisă la *Piricularia oryzae*, eficientă numai la distanțe extrem de mici, ca rezultat al „exploziei" unei celule care leagă sporul de conidiofor.

3) Scăderea presiunii de vapori descrisă la *Nigrospora sphaerica* și, de asemenea, la *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Helminthosporium* sp. Energia pentru eliberare și proiectare în spațiu derivă din apariția bruscă a unei faze gazoase în spor sau în sporofor. La unele specii, acest proces este asociat cu răsucirea higroscopică.

4) Eliberarea ascosporilor dintr-o ască prin ruperea bruscă și brutală a acesteia și diseminarea la distanțe variind de la cîțiva mm la 40 cm.

5) Formarea de pori temporari prin care sporii sînt expulzați, rînd pe rînd, sub acțiunea contracției peretelui elastic al ascei.

6) Eliberarea ca o entitate a întregului sporangiu cu masa de spori aderentă de o picătură de lichid expulzat la *Pilobolus*. Sporii sînt proiectați la o distanță de 1—2 m și în direcția celei mai mari intensități a luminii, respectiv într-o zonă în care prezența curenților care asigură dispersarea lor ulterioară este cel mai probabilă.

7) Emisia violentă a sporilor din cavitatea peritecială provocată de un corp străin, ca, de exemplu, atingerea de către o insectă în mișcare, la *Chitonomyces* sp. etc.

Figurile 219 și 220 prezintă principalele mecanisme cunoscute.

Eficiența dispersării în atmosferă a sporilor este condiționată de o serie de factori între care sînt de menționat în special:

1) nevoia de a străbate stratul laminar cu funcție de barieră și de a intra în stratul turbulent în care prezența curenților de aer favorizează purtarea lor la distanță;

2) mărimea sporilor individuali sau a agregatelor de spori. Sînt răspîndiți mai eficient sporii cu dimensiuni mici, care sînt depuși pe sol mai greu sub influența gravitației sau a precipitațiilor.

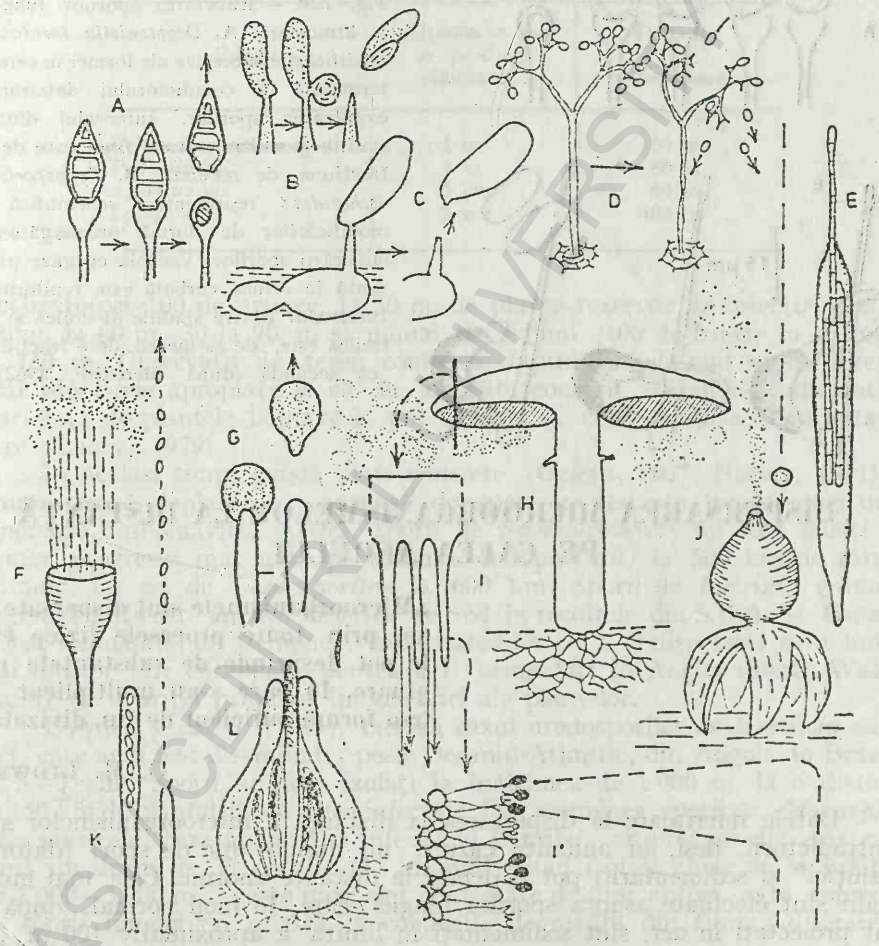



Fig. 219. — Mecanisme de dispersare a sporilor la fungi. **A.** *Deghtoniella torulosa*, prin ruperea conidiilor de celula terminală a conidioforului. **B.** *Calocera cornea*, prin eliminarea bazidiosporilor cu o picătură de exsudat lichid. **C.** *Sporobolomyces roseus*. **D.** *Peronospora tabacina*, dispersare prin răsucirea conidioforilor. **E.** *Trichoglossum hirsutum* cu șase spori în curs de eliminare. **F.** *Cookeina sulcipes*. **G.** *Entomophtora coronata*. **H, I, I'.** *Agariona campestris*. **J.** *Geastrum* sp. **K.** *Pyronema omphalodes*: asce înainte și după expulzarea sporilor. **L.** *Sordaria fimicola* (după Ingold, 1967).

Ingold (1967) semnalează existența unei periodicități circadiene a ritmului de eliberare corelată cu unul sau mai mulți factori de mediu, care prezintă acest gen de ritm (lumină, temperatură etc.). Astfel a înregistrat un ritm maxim dimineața înainte de răsăritul soarelui *(Sporobolomyces* sp.) sau puțin după *(Deghtioniella)*, dimineața tîrziu *(Phytophtora infestans)* sau timpuriu după amiaza *(Cladosporium, Alternaria, Ustilago)*.

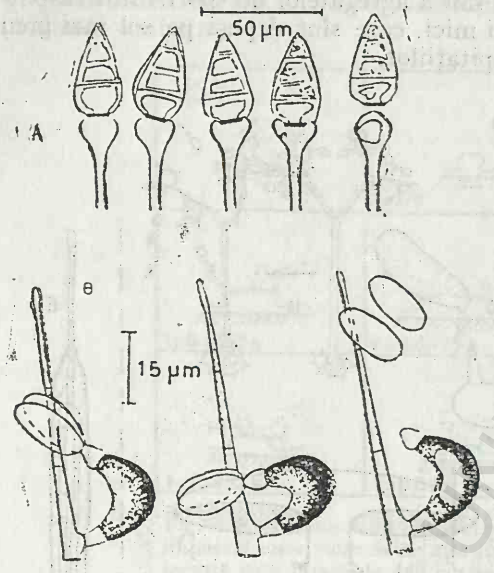



Fig. 220. — Eliberarea sporilor fungici în atmosferă. A. *Deghtoniella torulosa*: modificările succesive ale formei în celula terminală a conidioforului determină expulzarea sporilor. Intervalul dintre stadiile penultime și cel final este de o fracțiune de secundă. B. *Zygosporium oscheoides*: reprezentare schematică a modificărilor de formă premergătoare eliberării sporilor. Vacuola cu gaze prezentă în celula curbată este reniformă. Intervalul dintre stadiile al doilea și al treilea este, de asemenea, de o fracțiune de secundă (după Meredith, 1962).

## DISPERSAREA MICROORGANISMELOR LA DISTANȚĂ PE CALEA AERULUI

**„Microorganismele sînt dispersate în aer prin toate procesele fizice care le pot desprinde de substanțele originare, în care s-au multiplicat într-o formă suficient de fin divizată".**

O. M. Lidwell

Datele referitoare la dispersarea la distanță a microorganismelor sînt contradictorii, deși, în anumite cazuri, un număr mic de spori (datorită „diluției" și sedimentării) pot fi depuși la distanțe enorme. Cele mai multe studii sînt efectuate asupra sporilor fungici, care, în mod normal, după ce sînt proiectați în aer, sînt sedimentați în limita a aproximativ 100 m (tabelul nr. 38).

În prezența curenților de aer, dacă nu sînt „spălați" și depuși la sol de precipitații, ei pot fi antrenați la distanțe mari.

Aceste date au fost confirmate în experiențe de dispersare simulată a unui număr cunoscut de spori fungici, utilizați sub forma unui „nor" artificial, dintr-o sursă apropiată de sol, urmată de capturarea lor la distanțe fixe în jur: numai în mică proporție pot fi găsiți dincolo de 100 m de sursă.

În medie, 5—10% din sporii mari și un număr mai mare din cei mici sînt găsiți la nivele superioare în atmosferă, de unde pot „călători" la distanțe mari.

Limitele dispersiei pe orizontală sînt ilustrate și prin frecvența leziunilor induse la plantele sănătoase, situate la distanțe fixe de o plantă bolnavă. În cazul unei micoze a plantelor de cartof s-au înregistrat 300 de leziuni

*Tabelul nr. 38*

**Distanța de deplasare a sporilor cîtorva fungi într-o mișcare neturbulentă a aerului de 1 m/s** (după Gregory, 1973)

| Fungii | Înălțimea la care se produce eliberarea | Distanța de deplasare |
|---|---|---|
| *Helminthosporium* sp. | 1 m | 50 m |
| *Puccinia* sp. | 1 m | 80 m |
| *Agaricus* sp. | 5 cm | 40 m |
| *Lycoperdon* | 5 cm | 100 m |

localizate/per 100 de frunze, la 30 m de planta-rezervor de infecție, 100 de leziuni la 60 m, 30 la 90 m și numai 10 leziuni /100 de frunze la distanța de 120 m. Observații de teren confirmă faptul că cele mai multe infecții apar din surse apropiate și că, în anumite condiții, distanțele suficient de mari față de plantele bolnave le pot proteja pe cele sănătoase de contaminare (Lacey, 1979).

În același timp, există date concrete (Ogawa, 1967; Harley, 1971) ce demonstrează deplasarea „norilor" de spori la distanțe foarte mari unde generează îmbolnăviri. Astfel, sporii de *Sporobolomyces* au fost găsiți, în număr progresiv mai mic pe măsura îndepărtării, la 500 km de țărmul britanic, iar cei de *Cladosporium* la 600 km. Sporii de *Puccinia graminis* migrează în fiecare an din America de Sud în recoltele din S.U.A. și Canada. A fost semnalată, de asemenea, capacitatea lor de a fi dispersați de-a lungul mai multor țări europene, pentru a fi semnalați în Anglia (South Wales), înainte de apariția primelor îmbolnăviri ale plantelor.

Bowden și colab. (1971), citează cazul uredosporilor de *Hemileia vastatrix*, care ar fi fost diseminați, peste Oceanul Atlantic, din Angola în Brazilia în 5—7 zile. Sporii au fost izolați la înălțimea de 1 000 m, la o distanță de 150 km de plantațiile de cafea infectate. De asemenea, sporii de *Mycosphaerella musicola*, care au produs infecții în Caraibe, ar proveni din Australia, după un drum de 37 de zile (27 km/oră), fiind izolați chiar de la înălțimi de 2 000—3 000 m. Aceste date sînt contestate de unii autori, care consideră că sporii fungici nu rezistă la condițiile de mediu din timpul diseminării la distanțe mari.

Oricum, numărul enorm de spori/corp fructifer ($10^9$ — $10^{12}$) favorizează diseminarea chiar dacă numai un număr limitat de spori își păstrează viabilitatea. Diseminarea are o importanță ecologică deosebită, deoarece poate asigura „însămînțarea" sporilor într-un mediu nou, care prezintă un avantaj selectiv pentru supraviețuire și multiplicare (nutrienți, regiuni necolonizate de alte gazde etc.).

# ROLUL AERULUI ÎN TRANSMITEREA MICROORGANISMELOR PATOGENE PENTRU OM

Numeroase virusuri și microorganisme patogene care afectează căile respiratorii pot fi răspîndite prin intermediul aerului. Expulzarea lor este favorizată de proiectarea, cu diferite grade de violență, prin tuse, strănut, vorbit, ca și de creșterea cantitativă a diferitelor secreții, care în momentul eliminării forțate sînt frecvent rupte în picături mai mici. Distribuția lor după mărime depinde de viteza curentului de aer, de vîscozitatea lichidului și de structura anatomică prin care sînt proiectate.

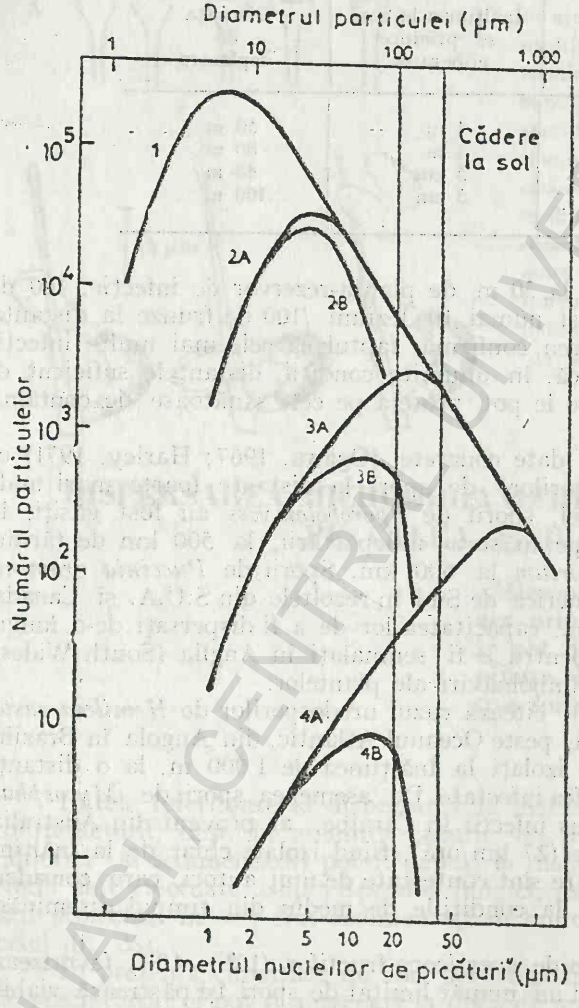



Fig. 221. — Distribuția după mărime a particulelor de secreție expulzate prin strănut și a „nucleilor de picătură" rezultați. Curbele reprezintă: **1.** Numărul și distribuția după mărime a picăturilor produse de un strănut ($10^6$ picături). **2A.** Numărul și mărimea picăturilor care conțin una sau mai multe bacterii viabile în cazul unei secreții ce conține $10^8$ celule vii/ml. **2B.** Riscul de expunere la „nucleii de picătură" proveniți din evaporarea picăturilor din 2A într-o cameră bine ventilată. **3A, 3B, 4A, 4B.** Aceeași distribuție ilustrată la 2A și 2B, în cazul secrețiilor infectate cu $10^6$ celule vii (3A și 3B) și respectiv $10^4$ bacterii vii/ml (4A și 4B) (după Lidwell, 1967)

Mecanismul cel mai viguros de expulzare este **strănutul**, care produce aproximativ un milion de picături, cu dimensiuni mai mici de 100 μm Ø, și cîteva mii de picături mai mari, formate din salivă și mai rar din secreții nazale (fig. 221). Acestea din urmă favorizează transmiterea agenților

patogeni în primele stadii ale infecțiilor respiratorii superioare. Ulterior, cînd vîscozitatea lor este mărită, rolul lor scade progresiv.

**Tusea** care expulzează un volum mai mic de aer și cu o viteză mai mică, produce un număr mai mic de picături, comparativ cu strănutul, și cu dimensiuni de cel puțin două ori mai mari (fig. 222). Cele cu dimensiuni

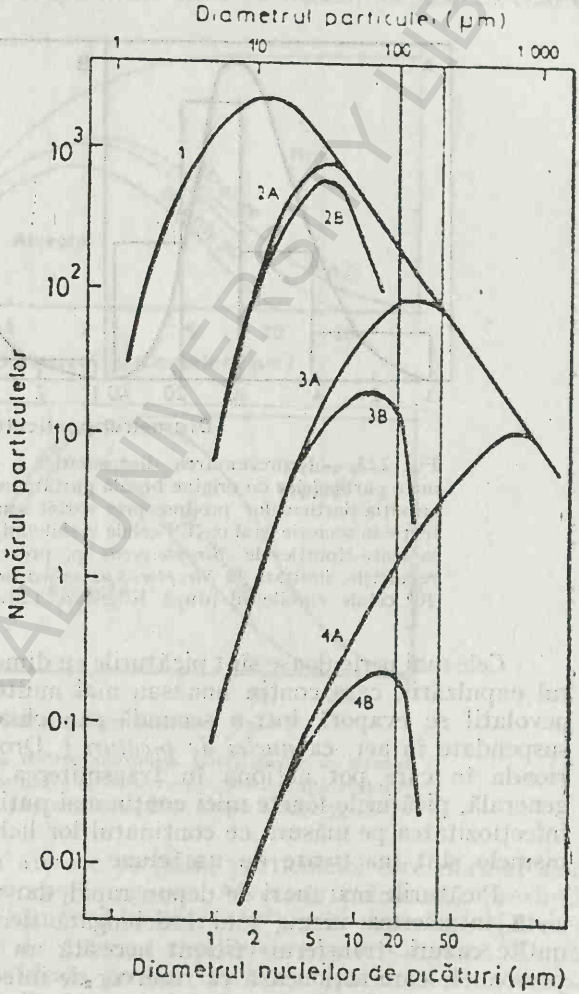



Fig. 222 — Distribuția după mărime a particulelor de secreție expulzate prin tuse sau vorbit tare și a nucleilor de picătură rezultați. **1.** Numărul și distribuția de mărime a $10^4$ picături produse după vorbit tare (4 000 de cuvinte) sau tușit (de două ori). **2A. 3A, 4A.** Aceeași distribuție în cazul secrețiilor infectate cu $10^8$, $10^6$ și $10^4$ celule viabile/ml, **2B, 3B, 4B.** Frecvența „nucleilor de picături" cu mărimi diferite formați prin evaporarea picăturilor descrise de curbele 2A, 3A și 3B (după Lidwell, 1967).

mari (> 100—200 μm) cad la pămînt înainte de evaporare. Ele pot redeveni periculoase, dacă sînt contaminate, cînd sînt resuspendate în aerul din camere prin curenții de aer sau diferite practici umane.

**Vorbitul** este asociat, de asemenea, cu eliminarea de particule potențial încărcate cu agenți patogeni. Numărul lor este totdeauna mai mic decît în cazurile precedente și variabil de la un individ la altul (fig. 223). Este foarte redus în cazul vorbitului normal și este maxim după pronunțarea unor consoane. Duguid (1945) a înregistrat în jur de 250 de picături la 100 de cuvinte.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Studiile experimentale au demonstrat că numărul microorganismelor prezente în picăturile expulzate pe diferite căi este corelat cu bogăția lor în secreții. În cazul secrețiilor care conțin $10^6$ bacterii/ml, 7% din picături conțin mai mult de o celulă bacteriană (diametrul picăturilor care conțin bacterii este de $\sim 13$ μm). Cînd secrețiile conțin $10^8$ bacterii, proporția picăturilor care conțin bacterii este de 40%.

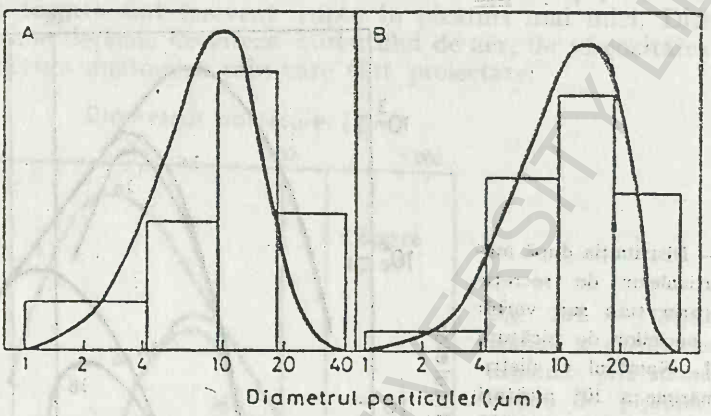



Fig. 223. — Reprezentarea diagramatică a distribuției după mărime a particulelor cu origine bucală purtătoare de streptococi. A. Distribuția particulelor produse prin vorbit sau tuse la un nivel de infecție în secreție egal cu $10^7$ celule viabile/ml (reprezentarea se referă la toate tipurile de *Streptococcus* sp. prezente în gură). B. Aceeași repartiție, limitată la *Streptococcus salivarius*, cu o concentrație de $10^6$ celule viabile/ml (după Kingston, Lidwell și Williams, 1962).

Cele mai periculoase sînt picăturile cu dimensiuni mici, încă din momentul expulzării, care conțin una sau mai multe bacterii, și al căror reziduu nevolatil se evaporă într-o secundă sau chiar mai repede. Acestea rămîn suspendate în aer, ca *nuclei de picături* („Droplet-nucleus"), prelungind perioada în care pot acționa în transmiterea agentului patogen. Ca regulă generală, picăturile foarte mici conțin mai puține microorganisme și își pierd infecțiozitatea pe măsură ce conținutul lor lichid se evaporă, iar microorganismele sînt inactivate de uscăciune.

Picăturile mai mari se depun rapid, dar virusurile, ca și bacteriile persistă în acestea vreme mai îndelungată decît în cele mici. De aceea, în multe cazuri, transferul eficient necesită un contact relativ apropiat între persoanele care acționează ca rezervor de infecție și cele sensibile.

Organismul uman dispune de mecanisme de îndepărtare a microorganismelor pătrunse pe căile respiratorii (expulzarea mecanică prin acțiunea cililor, imobilizare în mucus, mecanisme imunitare, fagocitoză, SIgA etc.).

Experimental, Gregory (1973, 1974) a demonstrat existența unei relații între mărimea particulelor infecțioase prezente în aer și situsul în care sînt reținute în sistemul respirator (fig. 224). Această corelație ține și de structura acestuia, ca și de viteza de circulație a aerului. De la nivelul traheii, prin diviziunea celor două bronhii principale și prin diviziunea repetată a acestora, diametrul căilor respiratorii este diminuat, iar suprafața

este mărită progresiv. Viteza de circulație a aerului scade, de asemenea, progresiv. Ea este de ~ 100 cm/s în trahee și în bronhiile mari, de cîteva zeci de cm/s în bronhiolele terțiare și de 1 cm/s în bronhiile cu diametru mai mic de 1 mm.

Particulele mai mari de 10 μm Ø sînt reținute în nas. Cele mai mici de 3 μm ajung în alveole. Cîteva particule sînt, de regulă, depuse în trahee

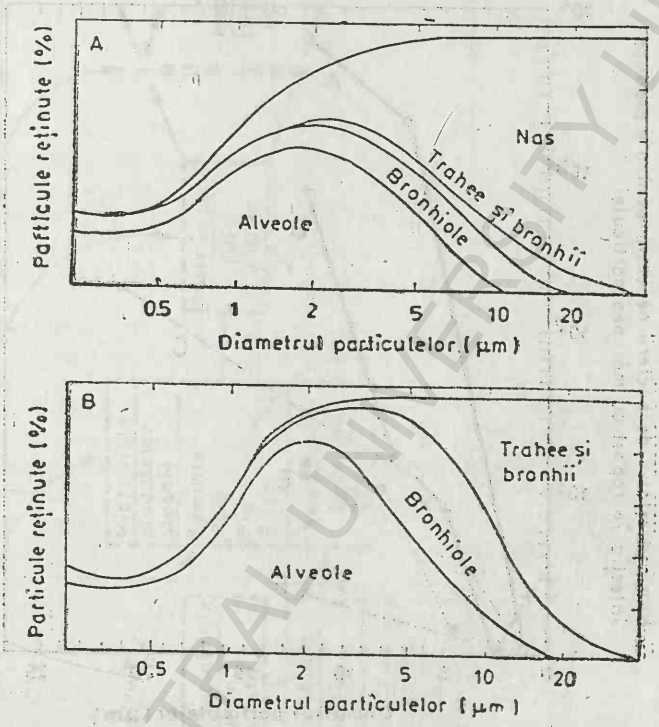



Fig. 224. — Relația dintre mărimea particulelor și situsul de depunere și de retenție în căile respiratorii, după respirație nazală normală **(A)** sau orală **(B)**, (după Gregory, 1974).

și în bronhii. Dacă respirația are loc pe gură, particulele, care normal sînt reținute în nas, pătrund în această regiune. Alveolele pulmonare prezintă condiții ideale de reținere prin numărul lor mare ($10^7$), prin suprafață (30 $m^2$) și prin faptul că sînt aproape de sistemul capilar de irigare sanguină. După Gregory (1973), dimensiunile ideale pentru reținerea particulelor în nasofaringe sînt de 8—16 μm (în medie 12 μm), iar pentru alveole de 2—4 μm Ø.

Druett (1967) demonstrează, pe baza rezultatelor proprii și a celor obținute de Goodlow și Leonard (1961), că există o corelație între numărul de microorganisme necesare pentru a produce infecția experimentală a animalelor sensibile și dimensiunea particulelor purtătoare (fig. 225). Corelația a fost demonstrată ca valabilă pentru *Bacillus anthracis, Brucella suis, Pasteurella pestis* și *Francisella tularensis*.

În afara virusurilor (*Adenovirus, Influenza* etc.) și a bacteriilor (*Mycobacterium tuberculosis, Corynebacterium diphteriae, Streptococcus pneumoniae* etc.), care afectează sistemul respirator, aerul poate să conțină, pe lîngă

polen, spori de microfungi care generează stări alergice. Între aceștia sînt citați cel mai frecvent sporii mari de *Puccinia* sp., *Alternaria* sp., reținuți în căile nazale, *Cladosporium* sp., reținuți în bronhiile mari care produc hipersensibilitate de tip imediat. Sporii mai mici de 5 μm proveniți de la *Actinomyces* sp. (Ø 1 μm), *Aspergillus* sp. și *Penicillium* sp. (3—5 μm) induc hipersensibilitatea de tip întîrziat.

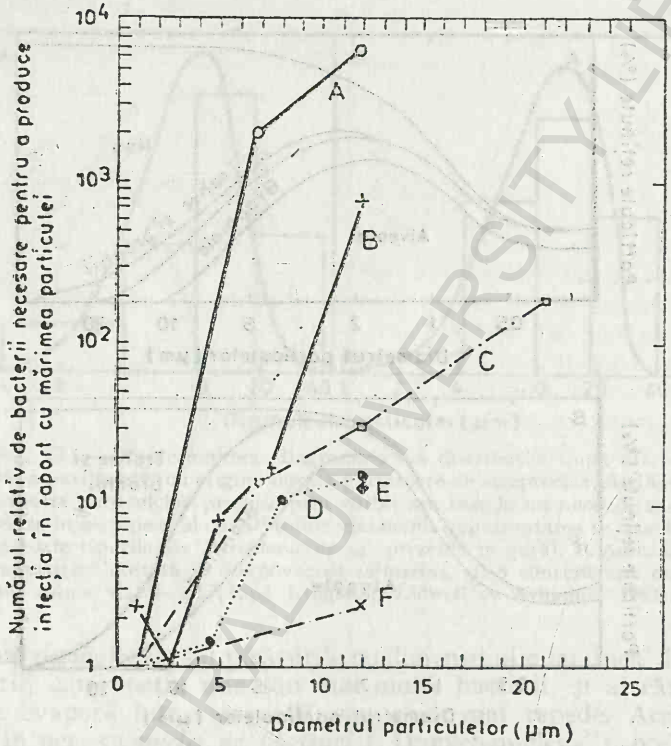



Fig. 225. — Numărul relativ de bacterii necesar pentru a produce infecția în raport de mărimea diferitelor particule. La cobai: *Francisella tularensis* (A), *Brucella suis* (B), *Bacillus anthracis* (D), *Pasteurella pestis* (F), La maimuțe Rhesus: *F. tularensis* (C) și *B. anthracis* (E) (după Druett, 1967).

Figura 226, după Lacey (1979), ilustrează interrelațiile comunităților de microorganisme și rolul aerului în dispersarea lor în natură, inclusiv în spațiile interioare, cu riscurile inerente, în cazul celor patogene, pentru om.

## MECANISME DE ELIMINARE A MICROORGANISMELOR DIN ATMOSFERĂ

„Norul" invizibil de microorganisme purtat de curenții de aer sau „plutind" în atmosferă pierde particule, adeseori mult mai constant decît primește particule noi eliberate de la interfața aer/sol.

Gregory (1967) a studiat valoarea relativă a diferitelor mecanisme.

Ploaia captează microorganismele și particulele din aer, în general,

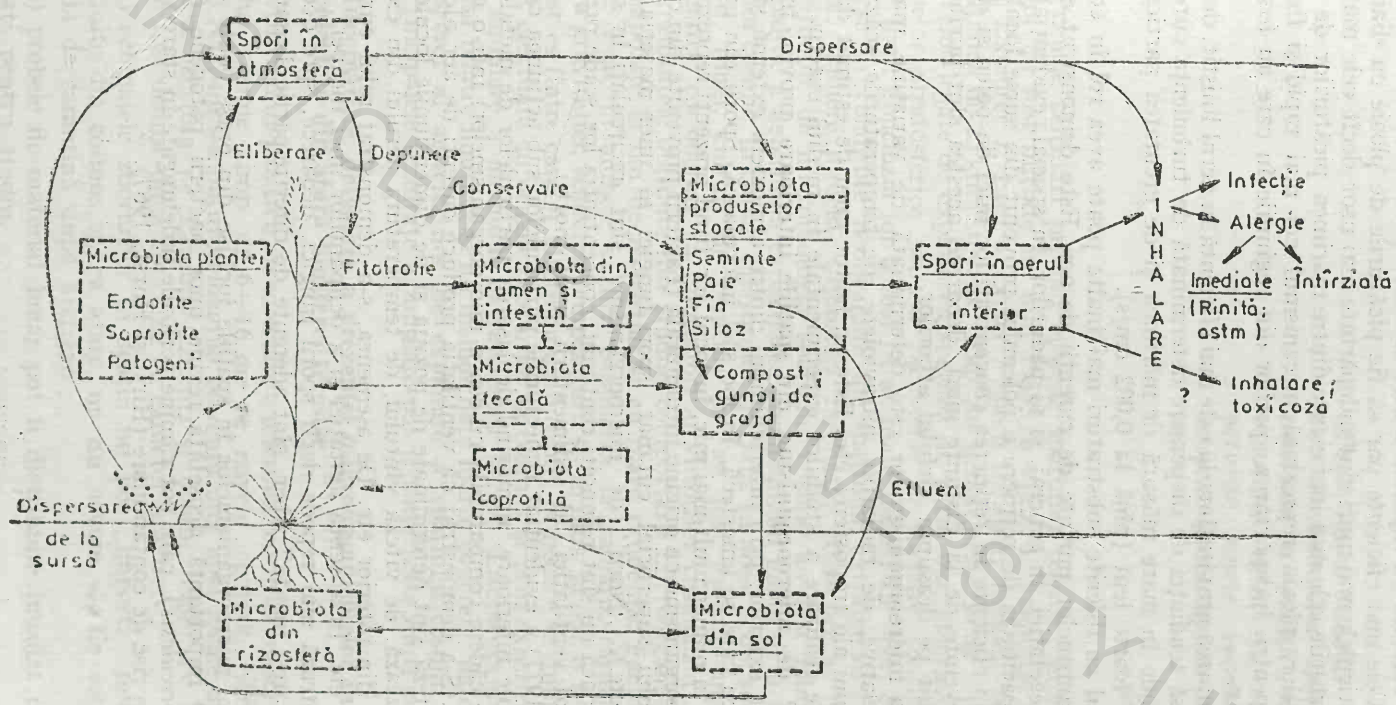



Fig. 226. — Reprezentarea schematică a interrelațiilor dintre comunitățile de microorganisme și a succesiunilor consecutive colonizării suprafețelor aeriene ale plantelor (după Lacey, 1979).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY
MICROBIOLOGIA

cu o eficiență corelată cu raportul dintre mărimea picăturilor și dimensiunea particulelor. Cele mai eficiente par să fie picăturile de ploaie cu diametrul de 2 mm. Particulele mai mari sînt îndepărtate mai ușor decît cele mai mici. Chiar în raporturile cele mai ineficiente dintre mărimea picăturilor de ploaie și a particulelor, ploaia reprezintă mecanismul cel mai rapid și final cel mai eficient pentru îndepărtarea sporilor din regiunile în care au fost proiectați în aer.

**Sedimentarea gravitațională** este mai eficientă în aerul liniștit, deoarece nu este expusă tendinței de dispersare determinată de turbulența curenților de aer. Depinde în mare măsură de mărimea și de greutatea particulelor. Se realizează foarte lent (pînă la 0,002 cm/s).

**Impactul** cu diferite substraturi mai înalte poate avea rol în colectarea microorganismelor purtate de curenții de aer. Este demonstrat efectul de filtru al vegetației, în general, și al pădurilor, în special, evidențiat indirect, prin capacitatea de reținere a polenului provenit din surse locale. Ele sînt mai puțin eficiente în reținerea concentrațiilor mici de polen și de alte particule provenite de la distanțe mari, deoarece acestea sînt purtate, de regulă, de vînt pe deasupra vîrfului arborilor.

**Moartea microorganismelor** este determinată de variațiile mari ale umidității relative, de radiațiile ultraviolete, de temperaturile scăzute în anumite regiuni ale troposferei etc. Este un factor greu de estimat datorită dificultății de realizare a studiilor experimentale în mediul extern.

**„Norii" de microorganisme din spațiile interioare** provin, în mare măsură, de la exterior, prin interschimbul dintre atmosfera externă și aerul din camere cu care se amestecă, în loc să-l înlocuiască. Sporii din exterior sînt prezenți în număr mult mai mic, în locul lor fiind prezenți reprezentanți ai unor microorganisme cu origine intramurală (bacterii provenite din descuamările stratului superficial cutanat, spori fungici ai unor materiale care mucegăiesc etc.). „Norii" de microorganisme sînt recirculați în spațiile interioare și dacă nu sînt reînnoiți continuu, concentrația lor scade progresiv ca rezultat al ventilației, al sedimentării și al morții.

Daws (1977) a evidențiat traiectoriile particulelor sub acțiunea curenților din spațiile interioare, urmărind deplasarea particulelor de metaldehidă (cu viteză de cădere comparabilă cu cea a microorganismelor) într-o cameră transparentă. S-a demonstrat că ventilația produce curenți de aer ale căror direcție și viteză sînt determinate de poziția și de dimensiunile locului prin care se realizează, de viteza vîntului, de temperatura aerului din exterior, ca și a celui din interior etc. De asemenea, s-a demonstrat rolul curenților de convecție etc. În absența agitației și a ocupanților unei încăperi, bacteriile sedimentează mai repede decît sporii fungici, deoarece, spre deosebire de aceștia, care „înoată" liber, sînt aderente de diferite particule sau substanțe reziduale.

Numărul microorganismelor în spațiile închise din orașe poate ajunge la $10^9/m^3$. O importanță deosebită revine unor bacterii patogene *(Mycobacterium tuberculosis)*, care pot rămîne perioade îndelungate în stare viabilă, prezentînd un risc de contaminare (Hirst și Hurst, 1967).

# MICROBIOLOGIA SPAȚIULUI COSMIC

„Deși unele studii efectuate în cursul zborurilor spațiale au fost realizate în condiții care au produs rezultate echivoce, ansamblul lor permite unele concluzii valabile asupra problemelor majore urmărite".

G. R. TAYLOR

Primele cercetări privind efectele spațiului cosmic asupra microorganismelor au fost inițiate în anul 1935, cu ajutorul balonului de mare altitudine Explorer 2, care a expus 7 specii de spori fungici, timp de 4 ore, la înălțimea de 25 km (Stevens, 1936). Au urmat peste 30 de studii premergătoare celor legate de explorarea spațială de către om, efectuate cu ajutorul baloanelor stratosferice sau al rachetelor de sondare (unele la înălțimea de 150 km). Concluzia lor a fost că un mare număr de spori fungici supraviețuiesc în condițiile neobișnuite ale spațiului extraterestru (temperaturi scăzute, iradiere directă, atmosferă rarefiată) (Beischer și Fregly, 1962).

Studiile de microbiologia spațiului cosmic au fost reluate cu scopul principal de a determina capacitatea organismului uman de a tolera rigorile mediului cosmic, în cursul călătoriilor spațiale. În acest scop, suspensii virale, bacterii, fungi, culturi de țesuturi etc. au fost asociate animalelor (cîini și primate), considerate ca înlocuitori ai viitorilor cosmonauți. În mod evident, rezultatele obținute din studiul comportării microorganismelor nu pot fi extrapolate la om decît parțial și cu mare prudență. Factorul principal de risc este, în ambele cazuri, expunerea la radiații, căruia i se adaugă absența gravitației, scăderea temperaturii și, în plus, la om, o serie de condiții de stres (între care și alternanța zi/noapte, la fiecare 45 minute). Studiile au fost efectuate cu ocazia zborurilor în cosmos și prin experiențe în condiții de simulare a mediului extraterestru la sol. Literatura de specialitate este însă relativ limitată și nu include date foarte concrete, datorită caracterului secret al activităților de explorare a spațiului cosmic.

Principalele rezultate acumulate pot fi sintetizate după cum urmează:

## Încercări de detectare a prezenței microorganismelor în probe colectate din afara biosferei terestre

Utilizînd dispozitive de colectare a micrometeoriților, deschise și expuse spațiului cosmic timp de 6—16 ore pe navele spațiale Gemini IXA și Gemini XII, nu s-a putut evidenția prezența nici unei forme de viață după revenirea acestora pe Pămînt (Lorentz și colab., 1968). Pe baza acestor date au fost deduse două concluzii cu caracter practic:

a) echipajele zborurilor în spațiu nu pot „importa" microorganisme neobișnuite din cosmos și, ca atare, nu au nevoie să fie reținute într-o perioadă de carantină după aterizare;

b) probele de material lunar pot fi distribuite imediat cercetătorilor interesați pentru studiu.

S-a mai demonstrat că atît vehiculele lunare, cît și alte componente ale activității extravehiculare, contaminate înainte de zbor pentru explorarea Lunii, nu determină contaminarea acesteia. Atît probele de material lunar, cît și unii componenți ai navei spațiale Surveyor III, readuși pe Pămînt de misiunea Apollo 12, după 2,5 ani, nu conțin microorganisme vii (Mitchell și Ellis, 1971). Fac excepție unii componenți interni ai unei camere de televiziune intens contaminați înainte de lansare cu *Streptococcus mitis*, de la care s-au izolat aceste bacterii încă viabile (Taylor, 1974).

## Efectele spațiului cosmic asupra microorganismelor

Primele studii de acest gen au fost efectuate de Antipov și colab. (1958), cu nava Sputnik 2, și dezvoltate de cercetătorii americani (Jenkins, 1968).

Au fost expuse acțiunii spațiului cosmic o serie de virusuri (virusul mozaicului tutunului, fagii T1 și T2 de la *E. coli*, fagul 1321 de la *Enterobacter aerogenes)*, unele bacterii *(Bacillus subtilis, B. megaterium, B. thuringiensis, B. stearothermophilus, Clostridium sporogenes)* și fungi *(Aspergillus niger, Penicillium roqueforti)*.

Concluzia acestor studii a fost că în condițiile respective, microorganismele nu sînt vulnerabile la acțiunea spațiului cosmic. Ceva mai mult, o tulpină de *Streptomyces* a crescut de șase ori mai repede după revenirea la sol decît tulpina-martor menținută în laborator.

Rezultate diferite a obținut Horneck și colab. (1984) în cazul experimentului Spacelab 1. Ei au expus 70 de probe de spori ai *B. subtilis* ($10^5$—$10^7$ spori/probă) în compartimente acoperite de cuarț, unele deschise și expuse direct vidului spațial, altele închise ermetic și menținute la presiunea de o atmosferă. Expunerea la vidul spațial reduce viabilitatea sporilor la 50% și crește frecvența mutațiilor de zece ori. Sensibilitatea la radiațiile ultraviolete este de 1,2—9,1 ori mai mare în vid decît în compartimentele menținute la o atmosferă.

## Nevoia de sterilizare a vehiculelor spațiale

Mai mulți cercetători au studiat posibilitatea transportului unor microorganisme din biosferă în spațiul cosmic. În acest scop, culturi pure de microorganisme (spori de *B. subtilis* sau de *Penicillium roqueforti* etc.), ca și o serie de suspensii virale (virusul mozaicului tutunului, *Poxvirus, Influenza virus*, tulpina Porto Ricco 8, virusurile rinotraheitei bovine infecțioase și o serie de bacteriofagi) au fost depuse nu numai în interiorul cabinelor spațiale, ci și în dispozitive expuse la exteriorul navelor Gemini 9A și 12. După 17 ore și 94,5 ore de zbor orbital circumterestru, virusurile au fost încă infectante, iar microorganismele viabile (Hotchin și colab., 1969).

La concluzii asemănătoare a ajuns și Bucker (1973), care a demonstrat un comportament similar pentru sporii de *B. subtilis*, în cursul misiunilor Apollo 16 și Apollo 17.

Concluzia lui Lorentz și colab. (1969) este că microorganismele care contaminează navele pregătite pentru zboruri spațiale și interplanetare pot supraviețui în cursul călătoriilor acestora, dacă sînt protejate de iradierea solară directă, și că, teoretic, sterilizarea lor înainte de lansare este necesară.

### Testarea efectelor spațiului cosmic asupra structurii genetice a microorganismelor

Teoretic, modificările genetice pot fi determinate de acțiunea radiațiilor ultraviolete (UV), a radiațiilor ionizante și a vidului spațial. În acest scop, unele virusuri (fagul T-7 *E. coli*), bacterii (*B. subtilis, B. thuringiensis*) și o serie de fungi (*Saccharomyces cerevisiae, Rhodotorula rubra, Chaetomium globosum, Trichophyton terrestre* etc.) au fost plasate în dispozitive speciale, în afara modulului de comandă al navei Apollo 16. Expunerea la acțiunea radiațiilor UV și a vidului spațial s-a făcut în cursul revenirii acesteia de pe Lună. Cu ajutorul a diferite combinații de filtre optice s-a realizat expunerea la diferite calități de iradieri solare ($\lambda = 254$, 280 și 300 nm) (Taylor și colab., 1972, 1974). Fagul T-7 expus la iradiere în cursul zborului este mult mai sensibil la acțiunea UV decît martorii iradiați la sol. Efectul letal este mare și a fost demonstrat prin diminuarea masivă a unităților formatoare de plaje*.

Mecanismul acestui efect nu este încă stabilit. Sporii inactivi ai bacteriilor sînt relativ rezistenți la acțiunea unei iradieri UV moderate, dar sînt mai sensibili la iradierea cu lumina totală provenită de la soare.

Pierderea cea mai importantă de viabilitate se realizează prin acțiunea combinată a vidului spațial, cu iradierea UV solară cu o lungime de undă $\lambda = 254$ nm. Este probabil că vidul spațial sensibilizează sporii la acțiunea UV solare.

### Efectul radiațiilor ionizante

A fost studiat în cazul programelor Gemini XI și Biosatelit II. Unul din studii a urmărit comportamentul conidiilor de *Neurospora crassa* depuse pe filtre de membrană Millipore sau suspendate în agar. Analiza probelor depuse pe filtre a arătat că nici supraviețuirea și nici frecvența mutațiilor nu sînt modificate după un zbor orbital de 71 de ore al navei Gemini XI (de Serres și colab., 1969). Pentru evidențierea efectelor genetice ale spațiului cosmic, Jukov-Verejnikov (1968) a utilizat sistemul fag $\lambda$/*E. coli* K 12 lizogenă, pornind de la premisa că inducția litică **, determinată de modificări ale aparatului genetic, poate fi considerată ca un indicator al unei activități mutagene a radiațiilor cosmice.

Rezultatele obținute de diferiți cercetători cu acest sistem sau cu altele similare sînt contradictorii. În general, expunerile de scurtă durată (2—25 de ore) nu afectează sistemul fag—bacterie. Cele de lungă durată nu influențează viabilitatea bacteriilor lizogene, dar determină inducția infecțiilor litice și o producție de fagi mai mare comparativ cu probele rămase la sol. Nu există o relație lineară între durata expunerii pe orbita circumterestră și excedentul de fag produs. Efectul radiațiilor cosmice este mai mare decît cel calculat, ceea ce sugerează intervenția unor factori adiționali.

Creșterea ratei de inducție litică în sistemul fag $\lambda$ — *E. coli* K 12 este considerată de unii cercetători ca determinată de modificările vibraționale din timpul lansării sau de alți factori mecanici care modifică sensibilitatea la ra-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 210.
** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 231.

diații a bacteriilor lizogene. În sistemul fag P-22 — *Salmonella typhimurium* rata inducției este diminuată. Taylor (1974) consideră că mediul cosmic exercită categoric un efect asupra sistemului de inducție litică a fagilor temperați, dar că intensitatea acestui efect depinde de acțiunea combinată a unor factori de mediu încă nedeterminați.

### Monitorizarea microbiotei cosmonauților

În cursul unor zboruri în spațiu au fost înregistrate diferite infecții ale echipajelor (rinite, faringite, stări gripale, infecții respiratorii ușoare, gastroenterite virale, unele infecții ale pielii etc.). Acestea au stimulat efectuarea unor studii, înainte și după zborul spațial, care au confirmat existența unor modificări în activitatea microorganismelor normale ale cosmonauților. S-a observat că, în general, numărul membrilor echipajelor de la care se izolează microorganisme patogene la întoarcerea din misiuni este mai mare decît înaintea lansării. De asemenea, numărul localizărilor din care se izolează *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. β-hemolitic și tulpini rezistente la antibiotice este mai mare după aterizare.

Aceste date pledează pentru un transfer între membrii echipajului în spațiul închis al navelor spațiale. O carantină la sol, prealabilă zborului, în condiții similare celor din timpul zborului, reduce incidența acestor fenomene, realizînd ,pe de o parte, o echilibrare a microbiotei și, pe de alta, permițînd agenților patogeni să se evidențieze. În felul acesta pot fi evitate stările infecțioase dinaintea și în timpul zborurilor. Fox (1971) consideră că în cursul zborurilor spațiale ar exista o creștere a activității toxigene (producere mai activă de β-hemolizine și fibrinolizine) la *S. aureus*.

Condițiile de mediu neobișnuit (în principal de spațiu închis) stimulează comportamentul „oportunist" al unor membri din microbiota normală. După o lună de existență în comun, numărul celulelor de *Candida albicans* din faringe este de treizeci de ori mai mare decît înainte de lansare. Au fost, de asemenea, semnalate disbacterioze orale și ale pielii determinate de diminuarea competiției (Alekseyeva, 1965). În plus, atît pe tegumente, cît și în fosele nazale se dezvoltă bacterii Gram-pozitive, care nu erau întîlnite înainte de zbor.

Wheeler și colab. (1967), urmărind modificările microbiotei cosmonauților în timpul zborurilor Gemini, constată o scădere a diversității bacteriilor și o creștere a numărului total de microorganisme ce pot fi izolate de la fiecare, probabil datorită transferului între membrii echipajului.

Cel mai amplu studiu, efectuat de Taylor (1972, 1974), care a urmărit prezența bacteriilor aerobe și anaerobe în nazofaringe, fecale și șapte localizări cutanate, a ajuns la următoarele concluzii:

1) numărul bacteriilor aerobe per cosmonaut după zbor este în medie de 8,3 ori mai mare decît înainte de lansare. Această creștere este realizată și prin creșterea numărului de genuri și specii, ceea ce pledează pentru transferul interuman;

2) s-a demonstrat transferul *S. aureus* între membrii echipajului;

3) creșterea masivă a bacteriei *Escherichia coli* în fecale;

4) numărul bacteriilor anaerobe rămîne nemodificat.

În cursul carantinei după zbor, structura microbiotei fiecărui cosmonaut revine la condiția anterioară.

Deși încărcătura microbiană a membrilor echipajelor navelor spațiale poate fi, în anumite limite, stabilă există și o serie de modificări determinate de:

1) transferul interuman;
2) creșterea incidenței anumitor agenți potențial patogeni;
3) creșterea toxigenezei unor bacterii;
4) diminuarea imunocompetenței.

Teoretic, aceste modificări ar putea influența activitatea echipajelor în cursul zborurilor de lungă durată.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# SOLUL CA MEDIU NATURAL PENTRU MICROORGANISME

# STRUCTURA ȘI DINAMICA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME DIN SOL

„Este probabil că problemele solului nu au nici măreția ieșită din comun a Universului și nici nu incită curiozitatea ca tainele interne ale atomului, dar ele influențează mai îndeaproape viața noastră de zi cu zi".

G. W. ROBINSON

„Solul este habitatul unor comunități de microorganisme extrem de complexe în care se produc toate fenomenele active în lupta pentru existență.
Așa cum este de așteptat, prin analogie cu evenimentele la macroscară, anumite grupuri și tipuri de microorganisme se pot stabili ca forme dominante în comunitate, în timp ce altele sînt deviate la un nivel subdominant".

H. KATZNELSON

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# SOLUL CA MEDIU NATURAL PENTRU MICROORGANISME
# STRUCTURA ȘI DINAMICA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME DIN SOL

**„Este greu de imaginat un mediu mai complicat decît solul pentru activitatea microorganismelor".**

R. G. BURNS

Într-o concepție ecologică, solul poate fi definit ca „sediul unui complex de substanțe — surse de nutrienți și de energie —, al unor organisme și microorganisme, însușiri și procese, determinat atît de compoziția și arhitectura sa proprie, cît și de totalitatea factorilor pedogenetici care-l influențează neîntrerupt, în special factori climatici și foarte frecvent cei hidrologici. El are capacitatea de a pune la dispoziția plantelor sprijin, apă, elemente nutritive, aer și căldură, indispensabile vieții și productivității lor". Are un specific ecologic, care îi determină potențialul productiv sau fertilitatea (Chiriță, 1974).

Solul este un mediu extrem de complex și heterogen, descris, în mod obișnuit, ca un sistem dinamic cu trei faze: *solidă*, *lichidă* și *gazoasă*. Ele sînt diferit aranjate în spațiu, atît la nivel macro-, cît și la nivel microscopic, realizînd în felul acesta marea diversitate a tipurilor de sol.

Dezagregarea rocilor parentale sub acțiunea unor factori fizici și chimici și a unor activități biologice determină transformarea acestora, inițial în sfărîmături de rocă („Regolith") și, ulterior, în timp, sub influența organismelor, a climatului și a condițiilor de mediu evoluează spre stadiul de sol. Un rol esențial în această evoluție revine proceselor de degradare biochimică a substanțelor organice neanimate (resturi vegetale și animale), care duc la producerea de materiale humice ce se amestecă cu compușii minerali rezultați din dezagregarea rocilor.

**Faza solidă** reprezintă aproximativ jumătate din volumul solului. Este alcătuită din substanțe minerale și organice. Este descrisă adesea ca o matrice a solului, care controlează forma, volumul și distribuția celorlalte două faze (Stolzy și Van Gundy, 1968). Cunoașterea organizării ei are o importanță fundamentală pentru înțelegerea proceselor care afectează natura și activitatea microorganismelor din sol.

*Fracțiunea minerală* are o compoziție variabilă în funcție de natura rocilor parentale, care pot fi:

— *roci vulcanice* (rezultate din solidificarea lavei (ca, de exemplu, granitul sau bazaltul);

— *roci sedimentare* (rezultate din depunerea și consolidarea produșilor rezultați din degradarea altor roci (ca, de exemplu, gresia, marna, dolomitele, șisturile argiloase, calcarele);

— *roci metamorfice* (ca, șisturile cristaline, cuarțitele, gnaisul, marmura), provenite din modificarea rocilor vulcanice sau sedimentare sub influența temperaturilor și/sau a presiunilor ridicate.

Rocile sînt infertile și reprezintă medii neadecvate pentru dezvoltarea microorganismelor. Ele pot, totuși, adăposti unele microorganisme-pionieri, cum sînt cianobacteriile, algele și unele eubacterii, ulterior microfungi și licheni. În general, bacteriile sînt localizate la nivelul unor fisuri care pot reține apa. Ele pot solubiliza silicații și alte minerale, producînd agenți chelatori și o serie de acizi organici care favorizează acțiunea de alterare a rocilor.

*Constituenții materiei solide* sînt reprezentați de fracțiunea minerală și fracțiunea organică aflate în amestec, legate fizic și chiar chimic.

Chiriță (1974) le caracterizează după cum urmează:

1) *Fracțiunea minerală* include două tipuri de constituenți:

— *fracțiunea nealterată* formată din minerale primare, derivată din roca parentală și alcătuită din particule grosiere de rocă (nisip, pietriș, pietre etc.) și din particule fine monominerale (nisip fin și praf);

— *fracțiunea alterată* formată din minerale secundare și alți produși secundari de alterare (argile, hidroxid de aluminiu, de fier sau de mangan, săruri, ioni), sub formă de particule fine (<0,002 mm) sau grosiere (concrețiuni), formînd *complexul de alterare*.

2) *Fracțiunea organică* este alcătuită deopotrivă din două categorii de substanțe:

— *fracțiunea nealterată* reprezentată de resturi organice neanimate provenite din litieră, lemn, rădăcini, diferite organisme și microorganisme;

— *fracțiunea alterată* formată din diferite fragmente și particule, aflate în diferite grade de descompunere, incluzînd și constituenții specifici esențiali ai solului reprezentați de materialele humice.

Diferitele substanțe care pot acționa ca nutrienți se găsesc fie în formă solubilă, fie adsorbite pe diferite substraturi, fie în stare insolubilă.

Din aceasta rezultă că deși solul conține cel mai adesea cantități suficiente sau chiar în exces de nutrienți, acestea sînt frecvent în forme inaccesibile plantelor. Transformarea lor în forme accesibile plantelor reprezintă una din acțiunile majore ale microorganismelor din sol.

**Faza lichidă** este reprezentată de apa din porii solului și de pe suprafața particulelor de sol. Ea conține în stare dizolvată sau de dispersie coloidală diferite substanțe minerale și organice, utile atît microorganismelor, cît și plantelor. Este cunoscută sub denumirea de *soluția solului*. Reprezintă între 0,1 și 1% din greutatea solului.

În funcție de rolul îndeplinit în sol au fost descrise mai multe categorii de apă:

1) *Apa gravitațională*, care umple porii pentru moment după precipitații și se scurge repede în funcție de diametrul porilor.

2) *Apa de higroscopicitate* absorbită de sol din umiditatea atmosferică. Este inaccesibilă plantelor, fiind reținută puternic ca o peliculă fină în jurul particulelor de sol.

3) *Apa capilară*, avînd două componente:

— *apa capilară neabsorbabilă*, care umple spațiile capilare cele mai fine și este inaccesibilă plantelor;

— *apa capilară absorbabilă* prezentă în porii cu diametru mediu, reținută de solul zvîntat. Este sursa principală de alimentare cu apă a plantelor în sezonul uscat (Chiriță, 1974).

**Faza gazoasă** corespunde aerului prezent în porii liberi de apă. Are o compoziție modificată față de aerul atmosferic, în sensul prezenței unei cantități mai mici de $O_2$ și a uneia mai mari de $CO_2$.

### Substanțele minerale din sol

Pe baza studiului a opt soluri din S.U.A., Buckmann și Brady (1960) furnizează următoarele date medii de compoziție a fracțiunii minerale: componentul major este siliciul prezent sub formă de $SiO_2$ în compoziția nisipului, prafului și argilelor. El reprezintă 75,42% din masa totală a solului. La acesta se adaugă: $Al_2O_3$ (9,68%), $Fe_2O_3$ (3,44%), $K_2O$ (1,78%), $Na_2O$ (0,96%), $TiO_2$ (0,72%), MnO (0,11%), din compoziția mineralelor argiloase, precum și CaO (1,33%), MgO (0,85%), $P_2O_5$ (0,11%), $SO_3$ (0,10%) și N (0,11%) (cantitatea de C echivalent cu materia organică este de 5,29%).

Compoziția solului reflectă pe cea a rocii din care s-a format. Există și devieri de la această compoziție medie, cum este cazul solurilor extrem de bogate în substanțe organice și virtual lipsite de siliciu, reprezentate de turbă.

Mineralele din sol sînt prezente sub formă de particule cu mărimi diferite, fiecare putînd să conțină mai mult de un tip de minerale și caracterizate în funcție de dimensiuni.

Particulele cu dimensiuni mai mari cum sînt nisipul și praful sînt relativ inerte datorită asocierii lor slabe cu materia organică. Rarele celule bacteriene evidențiate de microscopia cu scanning pe suprafața particulelor de nisip de cuarț sînt asociate fie cu microzone pe care s-au adsorbit substanțele organice, fie acoperite cu argile.

### Mineralele argiloase

Fracțiunea cea mai importantă pentru activitatea microorganismelor din sol este cea a mineralelor argiloase. Ca probă este și faptul că acestea sînt dispuse discontinuu pe suprafața particulelor de nisip. În lipsa substanțelor organice, bacteriile nu pot adera, deoarece nu pot sintetiza suficiente substanțe gumoase cu care ar putea adera direct. În plus, separarea din sol a mineralelor argiloase antrenează cu ele o mare parte din microorganisme. Prin structura lor, mineralele argiloase reprezentate de particule cu diametru mai mic de 0,02 mm formează fracțiunea cea mai activă a materialelor din sol.

Argilele pot avea compoziții chimice diferite în funcție de natura rocii parentale și de condițiile locale în care a evoluat procesul de pedogeneză (solificare). Ele au o structură cristalină sub formă de foițe suprapuse (bi-, tri- sau tetrastratificate), formînd în unele cazuri rețele rigide, în altele rețele gonflabile sau expandabile (care își măresc volumul prin absorbția apei în caz de umiditate mare sau se contrag în caz de uscăciune). Din punct de vedere chimic, sînt alcătuite în întregime sau în cea mai mare parte din minerale argiloase (aluminosilicați secundari hidratați, rezultați prin alterarea și hidratarea în diferite grade a silicaților primari), asociate cu oxizi hidratați de Fe, Al, Mn sau cu alți produși finali de alterare.

Dintre diferitele tipuri de argile, cel mai mult studiate pentru interacțiunile lor cu microorganismele sînt: *montmorillonitul* ($4\ SiO_2\ Al_2O_3 \cdot 2\ H_2O$), cel mai bogat în siliciu, *illitul*, asemănător micelor, și *caolinitul* ($2\ SiO_2 Al_2O_3 \cdot H_2O$).

Argilele diferă sub raportul proprietăților lor fizice și chimice prin mărimea particulelor (μm), prin suprafața lor ($m^2/g$) și prin capacitatea de a schimba cationi (miliechivalenți/100 g) (tabelul nr. 39).

*Tabelul nr. 39*

**Principalele proprietăți ale argilelor coloidale majore**

| Caracteristici | Caolinit | Illit | Montmorillonit |
|---|---|---|---|
| Mărimea (μm) | 0,1—5,0 | 0,1—2,0 | 0,01—1,0 |
| Suprafața ($m^2/g$) | 5—20 | 100—200 | 700—800 |
| Schimbul cationic (meq/100 g) | 3—15 | 15— 40 | 80—100 |

## Semnificația ecologică a coloizilor din sol

Diferitele tipuri de argile au proprietatea de a se dispersa în apă în particule cu dimensiuni coloidale. Împreună cu materialele humice, formează *fracțiunea coloidală a solului*, care influențează atît natura, cît și numărul microorganismelor din sol (Hattori și Hattori, 1976), deoarece controlează cele mai importante reacții chimice și fizicochimice. Pe lîngă acestea, solul conține și alte substanțe coloidale ca: oxizi și hidroxizi de Al, Mn și Ti, polizaharide etc.

Substanțele coloidale din sol au o serie de proprietăți cu consecințe ecologice majore pentru activitatea microorganismelor și pentru viața din sol în general:

Importanța excepțională a argilelor derivă din particularitatea generală a microorganismelor de a se localiza și de a fi active pe suprafața particulelor din sol, în sistemul porilor (în spațiile interconectate dintre agregatele de sol), în apropierea imediată a particulelor. Fenomenul a fost demonstrat prin experiențe de adsorbție pe substrate și constituenți din sol și confirmat ca valabil pentru mediile naturale prin microscopie electronică.

Datorită dimensiunilor mici, argilele au un raport mare suprafață/volum, situație care favorizează fenomenele de adsorbție și de interacțiune. Un gram de *montmorillonit* are o suprafață de 700—800 $m^2$. Pentru a ilustra importanța acestei suprafețe, Blum (1987) recurge la un exemplu ipotetic, în care un hectar de sol arabil conține pe o adîncime de 20 cm 3000 de tone de masă globală. Presupunînd un conținut de 20% minerale argiloase (respectiv 600 t), cu o suprafață medie de 200 $m^2/g$ și o concentrație de humină de 3% (respectiv 90 t), cu o suprafață medie de 1000 $m^2/g$ rezultă că suprafața principalilor coloizi din sol (argila și humina) însumează $21 \times 10^{10}$ $m^2$/hectar.

— Mineralele argiloase, ca și materialele humice au o mare afinitate pentru moleculele de apă. În consecință, diferitele substrate, enzimele extracelulare, metaboliții, nutrienții organici și anorganici și microorganismele au tendința să se concentreze la interfețele argilă/apă sau substanțe humice/apă și tind să lipsească din zonele îndepărtate de acestea. În felul acesta influențează aprovizionarea cu nutrienți și activitățile biochimice ale microorganismelor, precum și proliferarea lor. Adsorbția sau complexarea substanțelor organice sau anorganice *(complexele argile/nutrienți)* le protejează de o degradare bacteriană sau enzimatică extensivă.

Pe plan mai general, acest mecanism contribuie la distribuția inegală a nutrienților în sol: frecvent, substanțele solubile rezultate din degradarea resturilor vegetale sau din metabolismul microorganismelor sînt translocate la distanță și adsorbite pe argile sau pe materialele humice. Legați de aceste par-

ticule neanimate, o parte semnificativă din nutrienții din sol sînt protejați de utilizarea lor de către microorganisme.

— Argilele au funcția de reținere fizicochimică și de cedare prin schimb a unor cationi structurali ca, de exemplu, înlocuirea $Si^{4+}$ și $Al^{3+}$ cu ioni cu o valență mai mică. Electronegativitatea dobîndită în felul acesta este compensată prin adsorbția pe argile a unor cationi ($Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $K^{+}$, $Na^{+}$, $NH_4^{+}$, $H^{+}$) din soluția solului (Burns, 1981). Reținînd și cedînd alternativ prin schimb în soluția solului ionii necesari plantei, devin un adevărat rezervor de elemente nutritive pentru plante.

Acestor funcții majore li se adaugă altele, de asemenea deosebit de importante, ca: rolul în formarea structurii solului, asigurarea legăturii interne a materiei solului, avînd drept consecință *consistența* acestuia, influența asupra conținutului în apă și aer, ca și asupra temperaturii și reacției (pH) solului (Chiriță, 1974).

Celelalte particule gravimetrice din sol (praf, nisip, pietriș etc.) au suprafețe mici per unitate și nu acumulează nici apă, nici nutrienți organici sau anorganici. Deși atrag numai rar microorganismele, au o anumită importanță în biologia solului. Nisipul este important pentru că permite difuzia gazelor și a soluției solului. Praful are cea mai mică influență asupra proprietăților fizice, chimice și biologice ale solului.

## FORMAREA SOLULUI

Formarea solului sau solificarea este un proces complex și foarte îndelungat, în cursul căruia, prin intervenția unor mecanisme fizice, chimice și biologice, roca parentală (roca-mamă), sterilă și inertă, dobîndește caracterul de fertilitate, fiind convertită la stadiul de sol.

Pentru a evolua spre stadiul de sol este necesar ca roca parentală originară să posede o compoziție mineralogică adecvată. Ea trebuie să conțină toți constituenții minerali necesari, în proporțiile corespunzătoare pentru a asigura produsului final, solul, atît structura, cît și compoziția chimică ce condiționează caracterul de fertilitate.

Principalele etape ale acestui proces sînt următoarele:

1) **Dezagregarea**, un proces fizic de fragmentare a rocilor compacte sub influența unor factori din mediu, ca variațiile de temperatură (prin înghețul și dezghețul apei din interiorul rocilor), eroziunea, determinată de vînt, de apele curgătoare etc. În această fază, pe lîngă mase minerale de diferite dimensiuni (pietre, pietriș, nisip), se formează structuri cu porozitate mai mare și capacitate de a reține apa (prima însușire necesară evoluției spre stadiul de sol).

2) **Alterarea**, dezagregarea chimică sau biochimică, în cazul colonizării cu microorganisme-pionier (cianobacterii și alge) sau cu licheni, continuă procesul de fragmentare în particule tot mai mici, mărind, în același timp, capacitatea de absorbție și de reținere a apei. În această etapă se formează complexul mineral al solului.

3) **Instalarea și dezvoltarea biocenozelor proprii** reprezintă o etapă cu importanță esențială a solificării, deoarece asigură, în ultimă instanță, a doua condiție fundamentală a fertilității, respectiv aprovizionarea plantelor cu nutrienții necesari în forme asimilabile. Prin participarea microorganismelor și a

unor macroorganisme din sol se acumulează diferite substanțe organice și anorganice, care sînt mineralizate și convertite în forme accesibile plantelor.

4) **Formarea și acumularea humusului**, consecință directă a fazei anterioare, asigură, prin acțiunea mezofaunei și a microorganismelor, depozitul organic specific solului, component esențial al fertilității acestuia. El include, în forme relativ rezistente, ce pot fi mineralizate treptat de microorganisme, atît nutrienții necesari pentru dezvoltarea acestora, cît și pe cei care condiționează productivitatea optimă a plantelor.

## TEXTURA SOLULUI

Una din proprietățile care afectează natura și biologia microorganismelor din sol este *textura*, definită ca rezultat al proporțiilor relative ale diferitelor particule din sol (nisip, praf, argile etc.), respectiv al alcătuirii sale granulometrice. Tabelul nr. 40 prezintă criteriile de caracterizare a diferitelor tipuri de particule din sol, precum și relația dintre mărimea lor, numărul și suprafața per gram.

*Tabelul nr. 40*

**Relația dintre numărul, dimensiunile și suprafața diferitelor particule din sol**
(după Millar, Turk și Foth, 1958) *)

| Tipul de particule **) | Diametrul (în mm) | Numărul particulelor /g | Zona de suprafață ($cm^2$/g) |
|---|---|---|---|
| Pietre și pietriș | >2,0 | | |
| Pietriș fin | 1, 0—2,0 | 90 | 11,3 |
| Nisip grosier | 0,50—1,0 | 722 | 22,7 |
| Nisip mediu | 0,25—0,5 | 5 780 | 45,4 |
| Nisip fin | 0,10—0,25 | 46 200 | 90,7 |
| Nisip foarte fin | 0,05—0,10 | 722 000 | 227 |
| Praf | 0,002—0,05 | 5 780 000 | 454 |
| Argile | <0,002 | 90 300 000 | 11 300 |

*) Calculele sînt bazate pe diametrul maxim al fiecărui tip de particule, presupunînd că au forma rotundă.
**) >200 mm bolovani

În funcție de aceste criterii, solurile au fost etichetate ca aparținînd la diferite tipuri de textură. Spre exemplu, solurile dominate de o anumită clasă de particule sînt denumite după clasa respectivă ca sol nisipos, sol argilos sau sol prăfos. Cele nedominate de o anumită clasă de particule sînt denumite *luturi* (engl. = „Loam"). Există și clase intermediare de textură ca, de exemplu, argilă nisipoasă, argilă prăfoasă etc.

Pentru a determina tipul de structură al unui sol se recurge la o reprezentare grafică, sub forma unui triunghi echilateral, a cărui compartimentare este făcută în raport cu proporția, respectiv cu procentele celor trei

componenți granulometrici majori (argile, praf și nisip), cărora li se adaugă lutul (fig. 227).

Pe acest criteriu, în varianta clasică, triunghiul înregistrează 12 specii texturale: argilă, argilă nisipoasă, argilă prăfoasă, nisip, nisip lutos, lut, lut argilos, lut nisipos, lut prăfos, lut argilos nisipos, lut argiloprăfos și praf. Într-o variantă mai nouă (Chiriță, 1974), se mai adaugă trei specii și anume: argilă lutoasă, praf argilos și praf lutos.

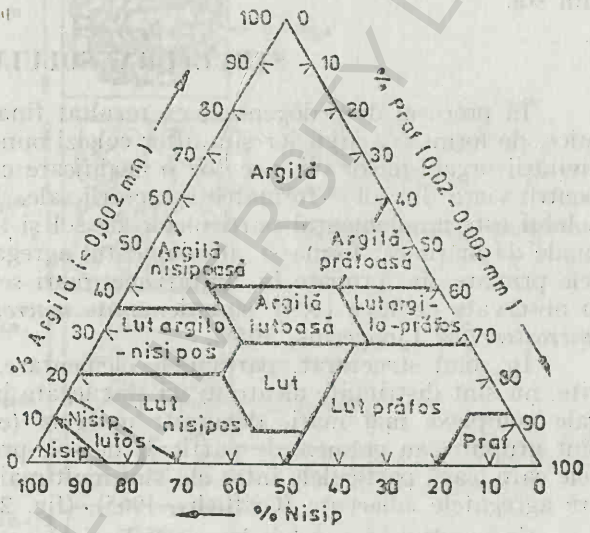



Fig. 227. — Determinarea clasei de textură a solului pe baza proporției de argile, nisip și praf. După determinarea procentului celor trei categorii granulometrice se trasează două linii: prima de la procentul de praf al solului, paralelă cu latura „procent de argilă" a triunghiului, iar cea de-a doua, de la procentul de argilă al solului, paralelă cu latura „procent de nisip" a triunghiului. Clasa de textură este indicată de compartimentul în care se intersectează cele două linii.

Vîrfurile triunghiului corespund la 100% din fiecare tip de particule: pentru argile (sus), pentru nisip (stînga) și pentru praf (dreapta). Bazele triunghiului, opuse fiecărui vîrf, marchează frecvența de 0% pentru fracțiunea texturală respectivă. Pentru determinarea tipului de textură se stabilește în prealabil proporția (%) fiecăreia din categoriile granulometrice descrise.

Pentru a determina numele clasei de textură se marchează procentul de praf și de la poziția lui se trasează o linie paralelă cu latura triunghiului care corespunde procentelor de argilă. După aceea se marchează procentul de argilă din solul studiat și se trasează de la nivelul său cu o linie paralelă cu latura triunghiului pe care sînt înregistrate procentele de nisip. Clasa texturală este indicată de denumirea suprafeței în care se intersectează cele două linii. Cînd poziția punctului de intersecție este apropiată de o altă unitate structurală se recomandă menționarea ei în denumirea tipului de textură a solului respectiv (spre exemplu „lut argilos spre lut argiloprăfos").

Chiriță (1974) insistă asupra caracterului relativ subiectiv al stabilirii limitelor „cîmpurilor texturale". El reflectă dificultățile de a opera cu combinații de trei componenți, care au la bază un element de aproximare, datorită neomogenității fracțiunilor de aceeași unitate de mărime în diferite soluri.

Solurile dominate de particule mari (nisip) au o textură grosieră și sînt denumite „ușoare". Cele cu textură fină, dominate de particule mici (care conțin multă argilă), sînt soluri „grele".

Textura solului este deosebit de importantă, deoarece caracterizează habitatul microorganismelor și explică interacțiunile spațiale ce pot apărea între populațiile de microorganisme care colonizează habitatul respectiv. Ea influențează ușurința sau dificultatea cu care un sol poate fi lucrat, gradul de aerare și de umiditate și însăși activitatea biologică a microorganismelor din sol.

## STRUCTURA SOLULUI

În procesul de pedogeneză, ca rezultat final al modificărilor fizicochimice, de formare a argilelor și a altor coloizi minerali, a humusului, și al activității organismelor vii, are loc o modificare cu importanță fundamentală pentru viața din sol — formarea structurii sale. După Low (1972), structura solului este aranjamentul particulelor de sol și al porilor dintre ele. Ea depinde de mărimea, forma și aranjamentul agregatelor formate cînd particulele primare sînt grupate în unități mai mari separabile. Structurile ce pot fi observate cu lupa (×4) sînt denumite *macrostructuri*, iar cele mai mici, *microstructuri* (Jongerius, 1958).

În solul structurat, particulele elementare, cu forme și mărimi diferite, nu sînt distribuite aleatoriu, ci sînt legate între ele, în unități structurale complexe mai mari, denumite *agregate* (engl. = „Crumbs"). Acestea sînt grupuri sau grămezi de particule de sol, prezente natural, în care forțele care leagă particulele între ele sînt mult mai puternice decît forțele dintre agregatele adiacente (Griffiths, 1965), (fig. 228).

Ca rezultat al așezării lor spațiale și al activității unor organisme vii, agregatele delimitează un sistem complex de pori cu forme și mărimi diferite. Datorită acestei „alcătuiri complexe, din particule de mărimi foarte diferite, grupate în elemente structurale, și acestea de diferite mărimi, separate printr-o mare varietate de pori" solul poate fi considerat, sub raport constitutiv, ca un *sistem heterogen polidispers, structurat și poros* (Chiriță, 1955, 1974).

Prin contrast, solul nestructurat este caracterizat prin depunerea cvasicompactă monogranulară, fără pori, a particulelor componente.

Structura solului — respectiv modul de agregare a particulelor componente — reprezintă un bun indicator pentru activitatea biologică, deoarece agregatele de sol delimitează cele mai importante microhabitate pentru microorganismele din sol. Ca fază solidă a solului, agregatele controlează cantitatea și distribuția apei și a aerului atît de importante pentru metabolismul microorganismelor. Ele sînt sediul contactului intim dintre particulele de sol, aer și apă cu nutrienții dizolvați și microorganismele. În plus, datorită heterogenității structurii lor, anumite zone din agregate pot furniza microhabitate în care anumite populații de microorganisme se dezvoltă separat de macromediul din jur (Stolzy și van Gundy, 1968). Structura influențează mediul fizic al solului și aceasta, la rîndul său, influențează activitatea biologică.

Un sol este considerat ca avînd o structură bună dacă menține suficientă apă pentru a împiedica deficitul de umiditate în jurul rădăcinilor în cursul perioadelor de uscăciune, dar care permite drenajul suficient pentru

a evita băltirea în cursul perioadelor umede. El trebuie să aibă suficienți pori plini cu gaze pentru a permite schimbul de gaze cu atmosfera, reducînd riscul formării de zone anaerobe. În aerobioză, activitatea microorganismelor este mai intensă și procesele de mineralizare evoluează în condiții optime.

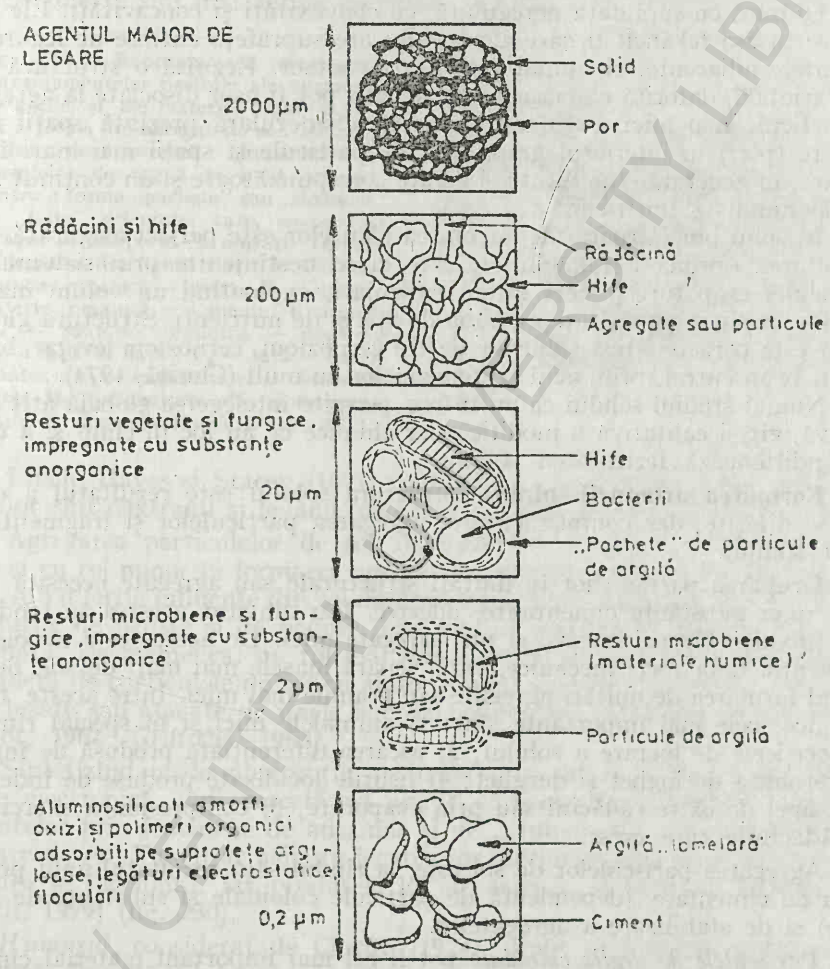



Fig. 228. — Reprezentarea schematică a microagregatelor de sol, cu cinci ordine de mărime, începînd de la nivelul particulelor de argilă la resturi de țesuturi vegetale și de fungi, și, final, la un agregat de sol cu diametrul de 2mm (după Tisdall și Oades, 1982).

Plantele găsesc în solurile structurate un mediu adecvat pentru creștere (oxigen, umiditate, nutrienți), iar rădăcinile care cresc străbat ușor spațiile delimitate de agregate, fără ca să întîmpine rezistență ca în solul compact. Perii absorbanți vin în contact cu suprafețe extinse ale microagregatelor.

Structura este importantă și pentru germinarea semințelor. Agregatele trebuie să fie suficient de mari pentru a împiedica eroziunea produsă de

vînt, dar nu atît de mari încît să reprezinte un obstacol mecanic pentru sămînța care germinează (Lynch, 1979). În solurile bine structurate, fauna este mai variată și mai numeroasă.

Structura optimă este cea *glomerulară* („măzărată") rezultată din asocierea particulelor de sol în agregate aproximativ sferoidale, cu diametrul de 0,2—5,0 mm, cu suprafața neregulată, cu convexități și concavități. Ele sînt dispuse în așa fel încît fiecare agregat nu are suprafețe extinse de legare cu agregatele adiacente, ci numai puncte de contact. Rezultă o structură afînată, friabilă, datorită căreia agregatele mari pot fi ușor disociate la agregate de particule mai mici. Solul cu structură glomerulară prezintă spații mici capilare (pori) în interiorul grămezilor de particule și spații mai mari între ele. Are, în general, o umiditate și aerare corespunzătoare și un conținut ridicat de humus și nutrienți.

În solul bine structurat, ancorarea plantelor este perfect asigurată prin dezvoltarea optimă a rădăcinilor, care cresc nestînjenite prin sistemul de canalicule, crăpături și pori intercanaliculari, exploatînd un volum maxim de sol și implicit o cantitate maximă de apă și de nutrienți. Structura glomerulară este caracteristică solurilor de tip cernoziom, cernoziom levigat, brun-roșcat, brun eutrof, brun acid și rendzinelor cu mull (Chiriță, 1974).

Numai studiul solului ca un întreg permite înțelegerea globală atît cantitativă, cît și calitativă a modificărilor chimice ce au loc în cîmp și a celor ce condiționează fertilitatea solului.

**Formarea structurii solului.** Structura solului este rezultatul a două procese diferite, dar complementare: agregarea particulelor și fragmentarea masei solului.

Gruparea particulelor în unități structurale sau agregate necesită prezența unor substanțe cimentante, adezive. Dar singure, acestea au tendința de a produce blocuri masive și nu agregate mici. De aceea, este nevoie de intervenția unor forțe mecanice, care separă masele mai mari de sol, determinînd formarea de unități agregate sau granule mai mici. Între aceste forțe mecanice, cele mai importante sînt: 1) animalele mici și în special rîmele; 2) procedeele de lucrare a solului; 3) uscarea diferențiată produsă de îngheț și alternanța de îngheț și dezgheț; 4) fisurile localizate produse de îndepărtarea apei de către rădăcini sau prin evaporare; 5) compresiunea exercitată de rădăcinile care cresc.

Agregarea particulelor de sol este, la rîndul său, rezultatul unui proces dublu de cimentare (dependentă de particule coloidale și substanțe de adeziune) și de stabilizare a agregatelor.

*Particulele de argile coloidale* pot fi cel mai important material cimentant din solul argilos saturat în $Ca^{2+}$ și $Mg^{2+}$. Ele se pot lega între ele în diferite moduri și se pot adsorbi puternic pe particulele de nisip și de praf, acționînd ca un ciment și menținîndu-le împreună (fig. 229), (Griffiths, 1965; Low, 1972). Frecvent, conținutul solului în argilă este corelat cu gradul său de agregare.

*Microorganismele* au un rol complex în formarea structurii solurilor. Rolul lor a fost demonstrat de Martin și Walksman (1940), care au obținut agregarea unor amestecuri dispersate (nisip de rîu/bentonită sau nisip de rîu/argilă) după infectarea lor cu microorganisme care sintetizează polizaharide *(Beijerinckia, Aspergillus niger, Rhizopus nigricans)* în prezența unui mediu nutritiv (sursă de C și N).

Rolul microorganismelor nu este determinat de numărul lor, ci de capacitatea de a produce polizaharide sau substanțe gumoase. Polizaharidele diferă enorm în capacitatea lor de a stabiliza structura solului. Cele mai active sînt cele cu g.m. 100 000 dal. După Russel (1971), polizaharidele care dau soluții cu vîscozitate mare sînt mai active decît cele cu vîscozitate mică, iar cele lineare sînt mai active decît cele globulare.

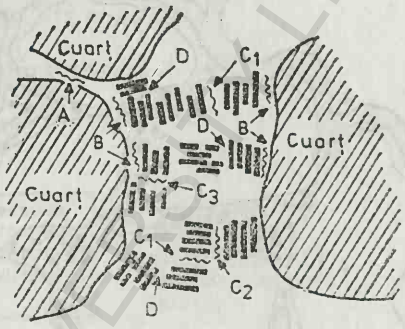



Fig. 229. — Reprezentarea schematică a aranjamentelor posibile ale cuarțului, ale argilei și ale materiei organice pentru a forma un agregat de sol. Metodele optice demonstrează „împachetarea" cristalelor de argilă în mod ordonat, pentru a forma „pachete" sau „domenii" de „foițe" orientate, care, suspendate în apă, se comportă ca unități. Tipurile de legături din figură sînt: **A.** Cuarț — materie organică — cuarț. **B.** Cuarț — materie organică — domeniu. **C.** Domeniu — materie organică — domeniu ($C_1$ = față în față; $C_2$ = față — extremitate; $C_3$ = extremitate — extremitate). **D.** Extremitate de domeniu — față de domeniu (după Low, 1972).

Finch, Hayes și Stacey (1971) consideră că agenții majori ai agregării solurilor sînt dextranii și levanii, cărora li se adaugă poliuronidele.

Agregarea particulelor de sol determinată de hife este, adesea, efemeră și cu rol minor în formarea agregatelor stabile: moartea lor sau distrugerea sub diferite influențe din sol diminuă agregarea. Rolul lor este mai mare în solurile de pajiște și de pădure, care conțin mai multă materie organică proaspătă. De asemenea, un rol mai semnificativ în agregare revine hifelor care aderă de particulele de sol cu ajutorul unor suprafețe lipicioase sau celor care, lezate sau atacate de unele bacterii, eliberează substanțe cu rol adeziv (Barrot, 1962; Griffiths, 1965).

Sintetizînd unele observații, realizate prin diferite tehnici de microscopie electronică, unii cercetători admit că bacteriile ar induce formarea agregatelor prin fenomene de adeziune și de „cimentare" a particulelor elementare de sol. Fungii ar asigura legarea lor mecanică prin intermediul hifelor care le înconjură, iar produsele lor ar asigura stabilizarea agregatului (Lynch, 1979) (fig. 230).

*Humusul*, considerat de Chiriță (1974) drept principalul formator de structură, datorită rolului său de aglutinare și cimentare a particulelor, influențează formarea de agregate prin intermediul polizaharidelor, proteinelor, poliuronidelor aminate și al substanțelor similare ligninelor pe care le conține. Efectul a fost demonstrat și experimental, prin capacitatea unor fracțiuni extrase din humus de a produce agregarea unor particule mici de argile (Swaby, 1950).

*Substanțele organice*. Exsudatele radiculare, țesuturile vegetale muribunde, ca și produșii rezultați din degradarea celor moarte favorizează agregarea și furnizează sursa majoră de substanțe stabilizatoare. Această acțiune este corelată cu efectul lor stimulator asupra dezvoltării bacteriilor și fungilor. Rolul vegetației și al substanțelor organice derivate din ea este sugerat

indirect și de structura foarte bună a zonelor utilizate perioade foarte îndelungate pentru păşunat (Lynch, 1979).

*Rădăcinile plantelor și regiunile periradiculare* exercită un rol complex, evident în cazul cultivării plantelor pe sol nisipos nestructurat: după dezvoltarea plantelor, o bună parte din particule rămîn asociate cu rădăcinile și cu perii radiculari. Acțiunea lor implică:

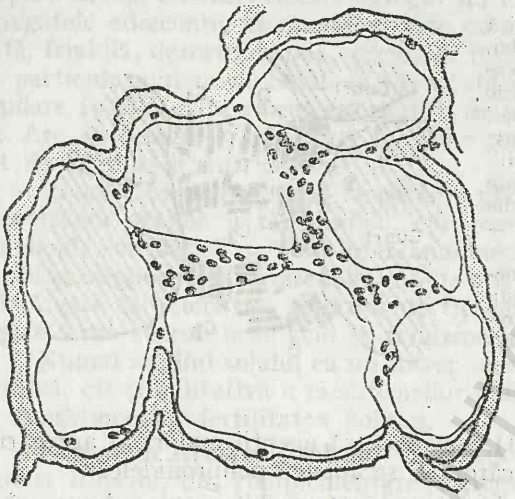


Fig. 230. — Reprezentarea schematică a modului de formare a agregatelor de sol. Bacteriile au rolul de cimentare a particulelor, în timp ce hifele fungice leagă grupuri de particule agregate (după Lynch, 1979).

1) efecte mecanice de separare a materialelor din sol în fragmente;

2) exercitarea unor presiuni asupra particulelor sau microagregatelor din sol, determinînd aderarea lor reciprocă mai puternică și schimbarea distribuției spațiilor poroase;

3) producerea de secreții aglutinante și exsudate, care măresc stabilitatea agregatelor și modifică umiditatea zonală;

4) crearea de ,,canale'' în zonele în care cresc etc.

După moarte, rădăcinile sînt degradate de bacteriile care trăiesc pe suprafața lor, cu producere de substrate gumoase ce difuzează, stabilizînd pereții canalelor ce devin spații poroase. Webley și colab. (1965) au demonstrat că bacteriile care trăiesc pe suprafața rădăcinii plantelor ierboase de pajiște produc o mai mare cantitate de polizaharide capsulare și de mucus decît echivalenții lor din rizosfera altor plante din sol în general.

*Fauna.* Rolul major revine rîmelor. Ele ingeră cantități mari de materiale vegetale și particule de sol, care sînt mărunțite și atacate de enzimele proprii și bacteriene din intestin. Ulterior, depun cantități imense de sol și dejecții sub forma unor agregate coprogene cu structură glomerulară.

Dimensiunea acestui efect poate fi apreciată prin faptul că rîmele reprezintă 50—75% din greutatea faunei din solul arabil (însumînd 2,5 milioane organisme/ha în solul arabil sau de pădure și circa 7 milioane/ha în solul de pajiște).

După Mulder, Lie și Woldendorp (1969), eficiența lor superioară în solurile de pajiște s-ar explica prin faptul că, datorită densității mari a rădăcinilor, găsesc cantități mari de hrană. În aceste condiții, conțin mai multe bacterii intestinale care produc polizaharide, ce asigură formarea mai multor agregate stabile, decît în solul arabil mai sărac în resturi vegetale.

Figura 231 prezintă sintetic interelațiile dintre organisme în procesele de formare și dezvoltare a solului.

*Sistemul poros al solului.* Constituenții minerali și organici care formează structura solului sînt stratificați în așa fel încît delimitează o serie de cavități, reprezentînd sistemul porilor. El reprezintă acea parte a spațiului pedologic în care se desfășoară ansamblul proceselor dinamice dintre fazele

lichidă, gazoasă și solidă ale solului sau, altfel spus, între conținutul porilor și peretele lor (Blum, 1987).

Porii au o deosebită importanță, deoarece reprezintă habitatul microorganismelor din sol și, în plus, asigură reglarea hidrică și gazoasă a acestuia. Ei reprezintă aproximativ jumătate din volumul solului (31—45% după Sunkel, 1961), cu posibilitatea de a crește cu 4% în cursul dezvoltării plantelor. Volumul ocupat de pori depinde de continuitatea lor și de natura,

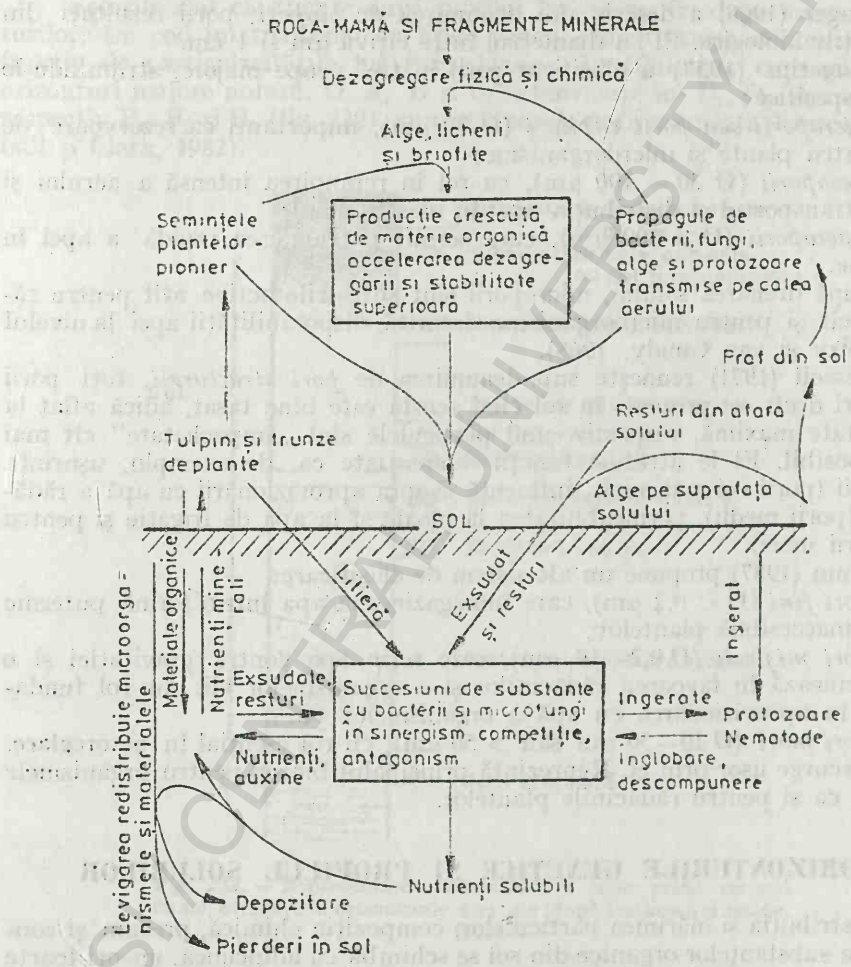



Fig. 231. — Reprezentarea sintetică a interrelațiilor dintre diferitele categorii de microorganisme în procesele de formare și evoluție a solului (după Campbell, 1977).

forma, mărimea și aranjamentul particulelor care îi delimitează, de condițiile de sedimentare, de conținutul în apă etc. (Low, 1972). Fiecare por diferă de altul prin formă, lungime, sinuozitate, continuitate. Frecvent, porii canaliculari sînt interconectați prin porțiuni constrictive ca niște „gîtuiri" (Darbyshire, 1975).

Sistemul porilor nu este imuabil, ci suferă transformări permanente, determinate de fenomene fizice de dilatare sau contracție a particulelor, de rădăcinile plantelor, de activitatea animalelor, de intervenția omului etc.

În formarea porilor, Russell (1971), pe lîngă structura solului (agregatele de sol au propriul lor sistem de pori cu geometrie complexă), atribuie un rol important „contracției", determinate de uscarea particulelor de sol, care formează crăpături sau canale în masa solului, rădăcinilor care creează canale sau le lărgesc pe cele existente, acțiunii lumbricidelor etc.

Slager (1966) a descris sub denumirea de *biopori*, porii rezultați din activitățile biologice. Ei au diametrul între cîțiva μm și 1 cm.

Jongerius (1957) a clasificat porii în trei grupe majore, atribuindu-le funcții specifice :

*Microporii sau porii capilari* (Ø 30 μm), importanți ca rezervoare de apă pentru plante și microorganisme;

*Mezoporii* (Ø 30 — 100 μm), cu rol în reînnoirea intensă a aerului și pentru transportul și distribuția apei în masa solului;

*Macroporii* (Ø > 100 μm), care permit pătrunderea rapidă a apei în adîncime.

După drenarea solului, microporii sînt situsurile active atît pentru rădăcini, cît și pentru microorganisme datorită disponibilității apei la nivelul lor (Stolzy și van Gundy, 1968).

Russell (1971) reunește sub denumirea de *pori structurali*, toți porii mai mari decît cei prezenți în sol cînd acesta este bine tasat, adică aflat la o densitate maximă, respectiv cînd particulele sînt „împachetate" cît mai strîns posibil. El le atribuie funcții diferențiate ca, de exemplu, ușurința cultivării (porii cei mai mici), influență asupra aprovizionării cu apă a rădăcinilor (porii medii), permeabilitatea la ploaie și la apa de irigație și pentru aer (porii mari).

Blum (1987) propune un alt sistem de clasificare:

*Pori fini* (Ø < 0,2 μm), care înmagazinează apa într-o formă puternic fixată, inaccesibilă plantelor;

*Pori mijlocii* (Ø 0,2—10 μm), care reține apa contra gravitației și o înmagazinează în favoarea rădăcinilor și a organismelor vii. Au rol fundamental în aprovizionarea cu apă a organismelor vii.

*Pori mari* (Ø 10—50 μm sau > 50 μm), cu rol esențial în aeroreglare. Apa se scurge ușor prin ei. Reprezintă principalul biotop pentru organismele din sol, ca și pentru rădăcinile plantelor.

## ORIZONTURILE GENETICE ȘI PROFILUL SOLURILOR

Distribuția și mărimea particulelor, compoziția chimică, precum și concentrația substanțelor organice din sol se schimbă cu adîncimea, uneori foarte evident și cel mai adesea în mod discontinuu. Litiera vegetală și celelalte resturi organice depuse pe suprafața solului sînt descompuse și deplasarea apei prin sol produce levigarea mineralelor solubile, în special dacă litiera este acidă. În acest proces are loc și deplasarea materialelor particulate în așa fel încît, de-a lungul timpului, se formează o succesiune de straturi orizontale, mai mult sau mai puțin bine definite, numite *orizonturi genetice*. Termenul *genetic* reflectă faptul că aceste diferențieri structurale s-au realizat în procesul de pedogeneză prin deplasarea și acumularea substanțelor minerale și

humice. Ele sînt definite de nivelul la care sînt localizate, de structura și textura diferite, de culoare etc.

Ansamblul orizonturilor genetice formează *profilul solului*, care poate fi evidențiat printr-o secțiune verticală, respectiv printr-o săpătură verticală pînă la roca parentală netransformată. Profilul complet al unui sol matur prezintă, în felul acesta, expunerea pe verticală a straturilor modificate pedogenetic în cursul perioadei de formare a solului și, de asemenea, straturile mai profunde care au influențat pedogeneza.

Solurile sînt clasificate după profilul lor, respectiv după suma orizonturilor. Un cod internațional cu litere permite identificarea orizonturilor, în funcție de particularitățile lor fizicochimice. Profilul tipic cuprinde patru orizonturi majore notate: O, A, B și C, subdivizate în: $O_1$, $O_2$, $A_1$ $A_2$ și $A_3$, respectiv $B_1$, $B_2$ și $B_3$ (fig. 232), cu următoarele particularități (Lincoln, Boxhall și Clark, 1982).

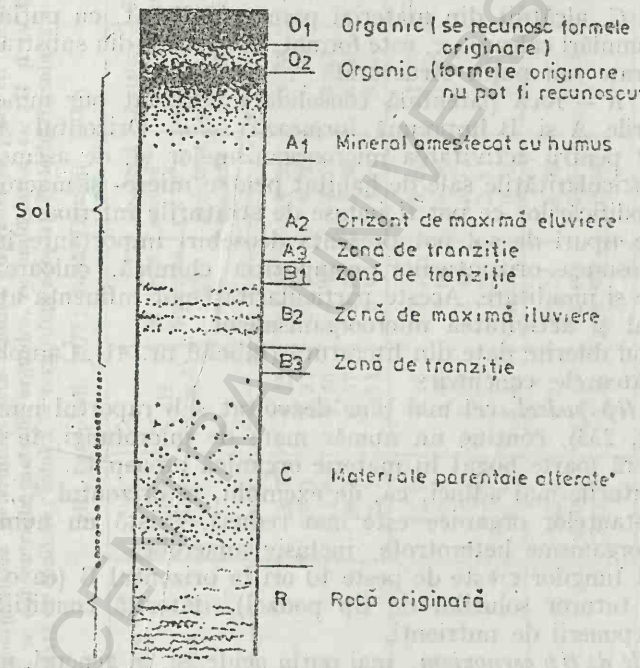



Fig. 232. — Reprezentarea schematică a unui profil vertical de sol, evidențiind orizonturile acestuia (după Buckman și Brady, 1969).

*Orizontul* $O_1$ (denumit anterior $A_{00}$) corespunde stratului de litieră, cu material organic fragmentat, în care se deosebește încă ușor structura resturilor vegetale originare. Materia organică este parțial descompusă prin procese de fermentație.

*Orizontul* $O_2$ ($A_0$) — de humificare — conține materie organică intens transformată, în care nu se mai recunosc macroscopic resturile vegetale.

*Orizontul* $A_1$ — închis la culoare, bogat în substanțe organice amestecate cu minerale.

*Orizontul* $A_2$ — de maximă eluviere* — cu conținut scăzut de substanțe organice. Este colorat mai deschis decît cel supraiacent.

*Orizontul* $A_3$ — de tranziție — este uneori absent.

Orizonturile $A_1$ — $A_3$ sînt orizonturi de maximă activitate biologică și eluviere. Ele reprezintă rezervorul major de nutrienți pentru plante și includ numărul cel mai mare de microorganisme și microfaună. Au o grosime medie de 40 cm (mult redusă la 10—15 cm în solurile de tip podzol).

*Orizontul* $B_1$ — de tranziție — este uneori absent.

*Orizontul* $B_2$ — de maximă iluviere** avînd o culoare închisă. Conține puțină materie organică. Este zona de acumulare a unor argile, silicați, oxizi de Fe, diferite minerale translocate din orizonturile superioare.

*Orizontul* $B_3$ — strat de tranziție.

Orizonturile $B_1$ — $B_3$, însumînd 60—100 cm, sînt orizonturi de iluviere, cu acumulări de argile, humus, oxizi de Fe. La nivelul lor, activitatea microorganismelor este redusă.

*Orizontul C*, alcătuit din material parental alterat, cu puțină materie organică și acumulări calcaroase, este format, în special, din substraturi minerale nestructurate sau puțin structurate.

*Orizontul R* — roca parentală consolidată. Orizont pur mineral.

Orizonturile A și B împreună formează *solul*. Orizontul A este cel mai important pentru activitatea microorganismelor și, de asemenea, pentru plante. Particularitățile sale de habitat pentru micro- și macroorganisme sînt expuse modificărilor ce pot fi induse de straturile inferioare.

Diferitele tipuri de sol pot prezenta deosebiri importante în: profilul individual, grosimea orizonturilor, compoziția chimică, culoare, textură, grad de aerare și umiditate. Aceste particularități pot influența atît natura, cît și numărul și activitatea microorganismelor.

Comentînd diferite date din literatură (tabelul nr. 41), Campbell (1977) prezintă următoarele concluzii:

*Solul de tip podzol*, cel mai bine dezvoltat sub raportul numărului de orizonturi (fig. 233), conține un număr mare de microfungi, în special în stratul de litieră foarte bogat în materie organică proaspătă.

În orizonturile mai adînci, ca, de exemplu, în orizontul $A_2$, unde concentrația substanțelor organice este mai redusă, există un număr relativ mic de microorganisme heterotrofe, inclusiv anaerobe.

Numărul fungilor crește de peste 10 ori în orizontul B (ca o particularitate comună tuturor solurilor de tip podzol), datorită condițiilor de pH mai acid și depunerii de nutrienți.

*În solurile de tip cernoziom*, mai puțin acide, și, în general, mai bogate în nutrienți disponibili, distribuția microorganismelor pe orizonturi este aceeași.

Numărul bacteriilor în orizonturile respective este mai mare decît în podzol, iar cel al fungilor egal.

*Turba* conține foarte numeroși fungi. La suprafață se dezvoltă un număr mare de alge și protozoare, probabil datorită umidității mai mari. Numărul bacteriilor, inclusiv anaerobe și actinomicete este relativ mic, ca o consecință a acidității ei.

---

* *Eluviere* — spălarea și translocarea materialelor suspendate sau dizolvate din orizonturile superioare ale solului sub acțiunea apei de precipitații infiltrată în sol.

** *Iluviere* — procesul de depunere și de precipitare în orizontul B a unor materiale care au fost eluviate sau levigate din orizontul A al unui sol.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

*Tabelul nr. 41*

**Numărul diferitelor grupuri de microorganisme determinat prin tehnica dispersiei pe plăci cu mediu soflsticat, în raport cu orizonturile solului, cu concentrația materiei organice, cu umiditatea, cu pH și cu tipul de sol.**

**Solul 1 = podzol dintr-o pădure mixtă de conifere ; solul 2 = cernoziom acoperit de ierburi ; solul 3 = turbă cu *Sphagnum* și *Polytrichum***

(din Campbell, 1977 ; după Timonin, 1935)

| Solul | Orizontul și adîncimea (inch *) | Umiditate (%) | pH (în apă) | Materie organică (%) | Bacterii aerobe** ($\times 10^6$/g greutate uscată) | Actinomicete ($\times 10^6$/g greutate uscată) | Bacterii anaerobe ($\times 10^6$/g greutate uscată) | Fungi ($\times 10^3$/g greutate uscată) | Alge ($\times 10^3$/g greutate uscată) | Protozoare ($\times 10^3$/g greutate uscată) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 Podzol | $A_0$ 0—3,5 | 48,7 | 6,55 | 64,17 | 28,30 | 5,70 | 0,10 | 242,50 | 1,00 | 0,10 |
| | $A_1$ 3,5—5 | 23,1 | 5,51 | 25,00 | 4,50 | 3,50 | 1,00 | 20,00 | 0,10 | 0,02 |
| | $A_2$ 5—8 | 13,6 | 5,50 | 4,47 | 1,55 | 0,95 | 0,01 | 1,63 | 0 | 0 |
| | B 8—23 | 19,1 | 6,37 | 2,60 | 3,30 | 0,90 | 0,10 | 10,63 | 0 | 0 |
| | C 23—37 | 18,7 | 7,81 | 0,95 | 1,14 | 0,12 | 0,01 | 1,47 | 0 | 0 |
| 2 Cernoziom | $A_1$ 0— 2 | 82,0 | 7,46 | 22,25 | 19,00 | 3,25 | 1,00 | 60,13 | 1,00 | 0,10 |
| | $A_2$ 2— 6 | 24,3 | 8,08 | 8,64 | 16,50 | 3,00 | 1,00 | 6,00 | 0,50 | 0,02 |
| | $B_1$ 6—16 | 31,7 | 8,09 | 2,45 | 16,73 | 0,65 | 1,00 | 2,50 | 0 | 0 |
| | $B_2$ 16—27 | 31,7 | 8,25 | 1,27 | 2,51 | 0,15 | 0,001 | 0,20 | 0 | 0 |
| | C 27—44 | 18,8 | 8,27 | 0,31 | 0,28 | 0 | 0,001 | 0,04 | 0 | 0 |
| 3 Turbă | 1. 0—18 | 500,7 | 4,78 | 90,24 | 2,90 | 1,15 | 0,10 | 372,50 | 10,00 | 10,00 |
| | 2. 30—37 | 620,2 | 5,43 | 68,00 | 2,74 | 0,01 | 0,10 | 3,10 | 0,50 | 0 |
| | 3. 70—76 | 750,0 | 4,39 | 88,91 | 0,06 | 0 | 0,10 | 0,88 | 0 | 0 |

*) 1 inch = 2,54 cm.

**) Cu excepția actinomicetelor.



BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Studiul repartizării microorganismelor în orizonturile genetice ale diferitelor tipuri de sol permite următoarele concluzii:

1) Este foarte greu de comparat distribuţia microorganismelor în diferite tipuri de sol, chiar dacă orizonturile sînt cunoscute şi datele provin de la un singur cercetător, care a utilizat un anumit set de metode;

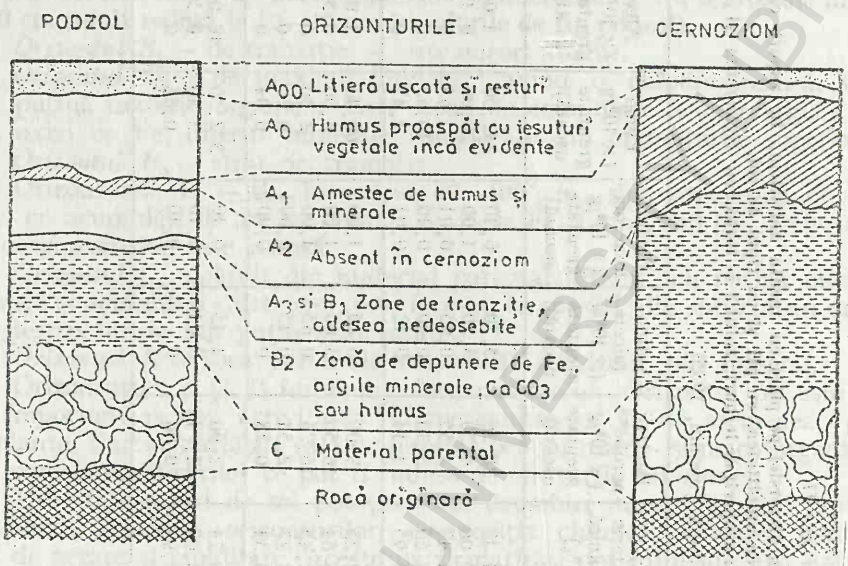



Fig. 233. — Reprezentarea schematică a orizonturilor şi caracteristicilor solurilor de tip podzol şi cernoziom (după Campbell, 1977).

2) Numărul heterotrofelor este strîns corelat cu concentraţia de substanţă organică. Fac excepţie mediile cu condiţii extreme, cum este turba, care are un pH acid. Ea ilustrează un caz de limitare a dezvoltării populaţiilor de microorganisme prin intermediul celui mai puţin favorabil factor din mediu;

3) Protozoarele şi algele sînt relativ puţin importante în sol, chiar cînd dezvoltarea lor este maximă ca în turbă;

4) Numărul bacteriilor chemotrofe este, probabil, mult mai mic în comparaţie cu heterotrofele (Campbell, 1977).

## FUNCŢIILE ECOLOGICE ALE SOLULUI

Solul are trei funcţii ecologice majore (Blum, 1987).

1) **Funcţia agricolă şi silvică** decurge din calitatea de substrat nutritiv, care asigură plantelor substanţele necesare pentru creştere şi, decurgînd din aceasta, producţia de biomasă vegetală reînnoibilă, în cea mai mare parte anual. Ea este condiţionată de *fertilitatea solului* definită drept „capacitatea de a pune la dispoziţia plantelor, în mod permanent şi simultan, substanţele nutritive şi apa în cantităţi îndestulătoare faţă de nevoile acestora şi de a asigura condiţiile fizice şi biochimice necesare creşterii şi dezvoltării plantelor, în ansamblul satisfacerii şi a celorlalţi factori de vegetaţie" (Davidescu,

1969). Din această definiție rezultă caracterul complex al funcției de fertilitate și dependența sa de prezența nutrienților, apei, aerării, temperaturii și condițiilor de pH adecvate și evident a microorganismelor. Aceasta pentru că, deși plantele evoluate se pot dezvolta *in vitro*, într-un ciclu complet, într-un mediu steril, care conține numai nutrienți anorganici, în condiții naturale, microorganismele sînt indispensabile pentru o creștere adecvată (Moulder, Lie și Woldendorp, 1969).

2) **Funcția de tampon, de filtru și de transformare** este o funcție complexă ce se exercită, pe de o parte, între atmosferă și pînza freatică și, pe de alta, între atmosferă, pînza freatică și plante. Ea implică între altele:

a) capacitatea acviferă, respectiv de absorbție a apei, de reținere temporară și de a o pune la dispoziția plantelor sau atmosferei sau de a o ceda apelor freatice. În regiunile de munte, această proprietate asigură reglarea hidrologică și protecția de fenomenele de eroziune;

b) funcția de filtrare mecanică și epurare ce asigură puritatea apelor freatice și a lanțului trofic;

c) funcția de filtrare, pe calea reacțiilor fizicochimice a diferite substanțe toxice anorganice, metale grele, radionuclizi și împiedicarea pătrunderii lor în apa freatică și potabilă sau în lanțul trofic;

d) biodegradarea substanțelor toxice organice prin acțiunea microorganismelor din sol și neutralizarea lor totală sau parțială.

3) **Funcția de protecție și rezervă genetică**, respectiv de asigurare a vieții organismelor (plante, animale, microorganisme) din sol și de menținere a diversității lor.

Acestor funcții ecologice, Blum (1987) le adaugă două funcții tehnico-industriale:

— *Funcția de infrastructură*, de asigurare a terenului necesar pentru implantările umane: instalații industriale, mijloace de transport, depunerea reziduurilor urbane și industriale;

— *Funcția de materie primă*, de furnizor al unor materiale solide, cum sînt: argilele, nisipurile, pietrișul, mineralele pentru producție tehnico-industrială, precum și de apă potabilă.

## Materia organică din sol

Absolut necesară pentru existența microorganismelor heterotrofe, materia organică din sol provine, în imensa majoritate, din afara acestuia și este formată dintr-o gamă largă de forme moleculare, în care predomină C, O, H, N și numai în cantități mici alte elemente. O parte din aceste molecule sînt imediat accesibile, în timp ce altele necesită transformări prealabile sub acțiunea unor enzime extracelulare.

Gray (1976) consideră că materia organică din sol conține, în proporții variabile, trei fracțiuni majore, ce se deosebesc prin vechimea lor:

1) Fracțiunea relativ ușor accesibilă microorganismelor, provenită, în principal, din descompunerea resturilor vegetale care se reînnoiesc anual sau cel puțin odată la cîțiva ani;

2) Produșii rezultați din degradare la forme relativ stabile prin metabolismul organismelor din sol avînd vîrsta de 25 de ani;

3) Materia organică foarte rezistentă la degradare, în special de natură humică. Ea include substanțe complexe rezultate din conversia unor produși

de degradare a lignineі sau din sinteza *de novo*, efectuată de microorganisme, din precursori aromatici și nearomatici. Ea poate avea vîrsta de 250—2 500 de ani.

Raportat la proprietățile fizicochimice, Burns (1983) împarte materia organică din sol în trei fracțiuni majore:

1) Substanțele organice „proaspete" care pot fi încă diferențiate fizic, incluzînd resturile vegetale și animale recent încorporate în sol și aflate în primele faze de dezintegrare și descompunere;

2) Substanțele solubile, ușor de identificat biochimic (glucide, aminoacizi, peptide, acizi organici etc.) provenite din degradarea celor din prima categorie;

3) Componenții polimerici, cu structură complexă și conținut predominant fenolic, asociați cu humusul.

Substanțele din primele două categorii au în comun sensibilitatea la degradare, iar cele din a treia sînt deosebit de rezistente și cel puțin o parte recalcitrante față de atacul microorganismelor din sol.

**Surse și estimări cantitative.** Cea mai importantă sursă de materie organică din sol este reprezentată de cantitățile imense de material vegetal depuse anual ca litieră (acumulări de frunze, fragmente de scoarță, semințe etc.), în care materialul vegetal recent căzut este numai parțial descompus încît organele plantelor pot fi încă identificate. El formează un strat gros de 1—3 cm în pădurile de rășinoase și de 3—6 cm în cele de foioase (Chiriță, 1974).

Pe plan global, Schlessinger (1975) apreciază valoarea resturilor organice de proveniență vegetală la $1{,}5 \times 10^{12}$ tone de C/an.

Cantitățile depozitate local sînt greu de estimat și variază în funcție de poziția geografică, de climă, de natura și vîrsta plantelor, de tipul de sol și, în oarecare măsură, de aportul organic provenit de la organismele animale și microorganisme. Aceste condiții variabile explică diferențele mari dintre estimări, considerate, spre exemplu, de Stout, Goh și Rafter (1981), ca fiind cuprinse între 0,5 și 15 tone/ha/an.

Evident, cea mai mare proporție din detritusurile vegetale provine din litieră și din rădăcinile moarte, deși, după Burns (1983), nu trebuie neglijate nici exsudatele, nici celulele radiculare descuamate (3,5 t/ha, după Coleman, 1976) și nici substanțele eliberate pe calea frunzelor. Aceasta explică de ce în pajiștile de stepă cu sol moderat acid, litiera, împreună cu rădăcinile și rizomii, pot depăși cantitativ de 2—3 ori cantitatea de masă organică dintr-o pădure de foioase din regiunile temperate (Chiriță, 1974). Jenkinson și Powlson (1976) apreciază cantitatea totală de carbon organic la 70 t/an, iar Alexander (1979) estimează cantitatea de materie organică la 20—100 t/ha, din care o mare parte a fost depusă cu un mileniu mai înainte.

Aceste date, deși cu un caracter relativ sînt, totuși, sugestive pentru imensa rezervă de substanțe organice vegetale depozitate în sol în fiecare an. În comparație cu aceasta, biomasa de origine animală (cadavre și excrete) este puțin însemnată (0,1 t/ha/an), ca și cea furnizată de microorganisme (0,17—2,21 t/ha/an) (Jenkinson și Ladd, 1981).

Cantitatea de substanță organică din sol depinde nu numai de aportul exogen, ci și de viteza cu care este descompusă și mineralizată în sol. Această viteză este dependentă de o serie de factori, la rîndul lor foarte variabili, care includ: diversitatea, densitatea și activitatea comunităților de microorganisme, temperatura și umiditatea, natura substratului și vîrsta plantelor expuse degradării (plantele tinere și țesuturile fotosintetizante conțin un

procent mai mare de glucide simple solubile și sînt mai ușor de degradat în comparație cu plantele bătrîne, care conțin cantități mai mari de celuloză, hemiceluloze și lignină. Un rol important revine compușilor cu N din sol și altor nutrienți minerali al căror deficit poate fi un factor limitant al degradării.

În funcție de acești factori și de condițiile locale se apreciază că 40—60% din materia vegetală din sol este descompusă și mineralizată în primul an. Restul este fie asimilată de generațiile succesive de microorganisme, cu eliberare treptată de $CO_2$, nitrați, fosfați etc., fie convertită în fracțiunea rezistentă la degradare din humus. Oricum, în anumite soluri, aproximativ 20% din materia organică este regăsită în diferite forme și după 5 ani.

**Natura substanțelor organice din sol.** În funcție de proprietățile lor chimice și de relațiile fizice cu constituenții solului, substanțele organice aparțin următoarelor categorii majore:

1) *Moleculele organice mici și difuzibile*, solubile în faza apoasă a solului sînt reprezentate de monoglucide, aminoacizi, acizi organici și de unii monomeri aromatici. Sînt accesibile ca atare unei părți importante din microorganismele din sol. Ele provin din degradarea resturilor organice adăugate recent în sol (litieră, exsudate radiculare, celule radiculare descuamate) din celulele microorganismelor și din metaboliții și produsele rezultate din acțiunea lor degradativă. Cantitățile prezente sînt foarte variabile în funcție de cantitățile globale ale compușilor din care provin. Eliade și Chiriță (1981) apreciază cantitatea de glucide prezente în solurile din România ca fiind cuprinsă între 65,62 și 181,87 mg/100 g sol. Cantitățile sînt mai mari în solurile cernoziomice (85,87 — 181,87 mg/100 g sol) și mai reduse în cele podzolite sau podzolice (65,62 — 103,75 mg/100 g sol).

Se adaugă substanțele solubile provenite din resturi și excrete animale a căror contribuție minoră cantitativ este deosebit de importantă prin suplimentul de N, P și S, elemente în care țesuturile vegetale sînt deficitare. Substanțele solubile pot fi preluate direct de microorganisme și utilizate în metabolismul lor intracelular. Prezența lor în sol reprezintă o precondiție esențială pentru dezvoltarea microorganismelor și pentru mineralizarea resturilor organice.

O fracțiune greu de estimat este totuși complexată cu diferite substraturi din sol și convertită la forme relativ greu degradabile sau chiar inaccesibile microorganismelor.

2) *Substraturile macromoleculare* includ o mare varietate de compuși organici cu structuri mai mult sau mai puțin complexe polimerice a căror utilizare necesită o degradare prealabilă sub acțiunea unor enzime extracelulare (tabelul nr. 42).

Cele mai importante sînt:

*Celuloza*, cea mai abundentă sursă de substanțe organice reînnoibilă anual, este estimată la $4 \times 10^{10}$ tone/an (Coughlan, 1985). Este degradată de o serie de microorganisme (vezi cap. *Degradarea microbiană a celulozei)* la glucoză, celobioză și un număr mic de oligoglucide). Susceptibilitatea la degradare variază în funcție de proveniență, respectiv de natura și vîrsta plantei, respectiv de raportul cantitativ dintre regiunile amorfe (accesibile microorganismelor și enzimelor lor extracelulare) și cele cristaline.

*Hemicelulozele* reprezintă, de asemenea, un volum enorm de biomasă vegetală, reînnoibilă anual. Polimerii de hexoze și pentoze, cu sau fără acizi

*Tabelul nr. 42*

**Principalele substraturi macromoleculare prezente în sol**

(după Burns, 1983)

| Substratul macromolecular și originea lui * | Structura moleculară | Moleculele înglobate în celule (cunoscute sau probabile *) |
|---|---|---|
| Celuloză (P, M) | Glucan (legături β-(1-4)-D) | Glucoză, celobioză |
| Hemiceluloze (P) | Xilani (legături β-(1-4)-D)<br>Glucuronani<br>Galacturonani | Xiloză, xilobioză<br>Acid glucuronic<br>Acid galacturonic |
| Pectine (P, M) | Xiloglucani<br>Galacturonani | Xiloză<br>Acid galacturonic |
| Amidon (P, M) | Glucani (legături α-(1-4) și α-(1-6)) | Glucoză, maltoză |
| Lignină (P) | Polimeri de alcooli p-hidroxicinamil | Monolignoli (alcooli coniferilic, sinapilic și p-cumarilic), di- și trilignoli. |
| Chitină (A, M) | N-acetilglucozamină legată β-(1-4) | N-acetilglucozamină<br>Chitobioză |
| Proteine și peptide (A, M, P) | Polimeri de aminoacizi | Aminoacizi, peptide mici |
| Lipide (A, M, P) | Trigliceride, fosfolipide | Glicerol, acizi grași |
| Peptidoglican (M) | Polimeri de N-acetilglucozamină și acid N-acetil muramic cu peptide | N-acetilglucozamină, acid N-acetil muramic, aminoacizi, peptide mici |
| Acizi teichoici (M) | Polimeri de polioli fosfați cu glucide și D-alanină | Glicerol, ribitol, mono- și diglucide, alanină |
| Exopolizaharide microbiene (M) | Manani, dextrani, levani, xantani, pululani, alginați | Mono- și diglucide |

P = plante; A = animale; M = microorganisme.
* Diferă la diferitele microorganisme.

uronici, sînt degradați, de asemenea, în prealabil de o serie de enzime microbiene extracelulare (vezi cap. *Degradarea microbiană a hemicelulozelor*).

*Lignina*, care reprezintă cantitativ, după Burns (1983), cel mai important substrat vegetal, după celuloză, este un complex cu o arhitectură moleculară complicată. Ea reunește printr-o varietate de legături intermoleculare alcoolii coniferilic, p-cumarilic și sinapilic. Degradarea ligninei, implicînd procese enzimatice complexe, este complicată de asocierea ei cu celuloza, hemicelulozele și pectinele în structuri fizic integrate în alcătuirea peretelui celulelor vegetale.

*Polimerii de natură microbiană* sînt reprezentați de chitină (provenită din peretele fungilor), peptidoglicani (mureina) și acizii teichoici de origine bacteriană. Un rol aparte din punct de vedere funcțional și cantitativ revine *polizaharidelor bacteriene extracelulare* cum sînt levanii, dextranii, xanthanii, alginații etc., sursă importantă de glucoză, arabinoză, manoză, galactoză, ramnoză, xiloză, acizi uronici (acid glucuronic și galacturonic), glucozamină etc.

**Complexele argilă — substrat.** O mare parte din substanțele organice sînt asociate intim cu fracțiunea minerală din sol.

McGill și Paul (1976) apreciază că 40—50% din azotul aminoacizilor este adsorbit pe coloizii organici. Greeland (1971), citat de Burns (1983), apreciază că 52—98% din carbonul din sol este legat de coloizii minerali. Experimental s-a demonstrat capacitatea unei game largi de molecule de a se lega de argile.

Fenomenul are o importanță deosebită. Astfel, adsorbția polizaharidelor (celuloză, pectine, amidon, glicogen, dextran etc.) scade sensibilitatea lor la biodegradare. Ea implică intervenția unor mecanisme complexe (forțe van der Waals, legături de H, schimbări ionice, punți ionice polivalente), care asigură formarea de complexe chimice a căror desorbție este foarte dificilă În plus, unele polizaharide se pot lega în spațiile interlamelare ale unor argile, fiind astfel izolate de acțiunea enzimelor și de accesul microorganismelor.

Complexele argilă — substrat pot conține purine, pirimidine, acizi nucleici, fosfați organici, ca fitina și hexozo-fosfați, și — deosebit de important — materiale din humus.

Complexele argilo-humice realizate prin complexarea materialelor fulvice și humice cu Ca, Fe, Al și alți cationi la suprafața substanțelor minerale adaugă o cotă suplimentară recalcitranței la degradarea proprie a acestor compuși.

**Complexele materiale humice — substrat.** Substanțele organice pot fi asociate cu humații din sol prin trei mecanisme distincte: 1) adsorbția pe suprafețe încărcate electric; 2) capturarea în structura lor tridimensională; 3) legarea chimică de polimerul humic.

Fenomenul a fost probat pentru o gamă largă de compuși care includ: polizaharidele și substanțe derivate prin degradarea lor, peptide, proteine, fenoli, antracene, antibiotice, constituenți citoplasmatici sau parietali ai celulelor bacteriene, fungice sau algale, și chiar pesticide.

Trăsătura comună a acestor procese este cea de reducere a accesibilității enzimelor și de creștere a rezistenței la degradare. Chiar diferiți compuși de degradare ai polizaharidelor sau proteinelor ușor metabolizabili ca atare devin foarte rezistenți după ce au devenit parte integrantă a complexelor humice.

Se apreciază că fenomenele de complexare a diferite substrate cu substanțele humice le extinde durata de viață în sol pînă la 10 ani.

# HUMUSUL

**„Studiul solului nu numai că stimulează o înţelegere mai completă a relaţiilor chimice şi biologice dintre microorganisme şi sol, şi a importanţei lui ca sistem biologic dinamic, dar furnizează, în acelaşi timp, informaţii cu valoare practică considerabilă pentru agricultură".**

J. H. QUASTEL

Principal constituent specific al solului şi factor esenţial al fertilităţii acestuia, humusul este un complex de substanţe coloidale amorfe, de culoare brun-neagră, format prin descompunerea parţială a resturilor vegetale, animale şi microbiene. El corespunde acelor fracţiuni de materie organică ce au fost transformate suficient pentru a nu mai păstra nici o urmă din structura anatomică a resturilor vegetale din care derivă.

Materialele humice prezente în solurile minerale reprezintă mai puţin de 10% din greutatea acestora.

## Constituenţii humusului

După Pauli (1973), constituenţii humusului sînt sisteme coloidale interconectate tridimensional, cu natură predominant aromatică, cu caracter fenolic, chinoinic sau cetonic, posedînd dimensiuni moleculare variate şi aparţinînd heteropolicondensatelor cu mare rezistenţă la atacul microbian.

Humusul este alcătuit din două grupuri principale de constituenţi (Chiriţă, 1974): constituenţii specifici sau substanţele humice propriu-zise şi constituenţii nespecifici (nehumici), reprezentaţi de diferite substanţe organice, în diferite grade de degradare şi eliberare din ţesuturile din care provin (lignine, celuloză, hemiceluloze, pectine, proteine), precum şi diferiţi intermediari de descompunere (monoglucide, aminoacizi, acizi organici, fenoli etc.).

**Substanţele humice propriu-zise** pot fi grupate în funcţie de solubilitatea lor în următoarele fracţiuni:

1) *Fracţiunea solubilă* în soluţii alcaline este reprezentată de aşa-numiţii *acizi humici*. Componenţii ei pot fi separaţi în *acizi fulvici* hidrosolubili, neprecipitabili din soluţia alcalină prin tratare cu acizi (HCl sau $SO_4H_2$), şi *acizi huminici*, precipitabili cu acizi din soluţia alcalină. Acizii huminici pot fi fracţionaţi în acizi himatomelanici, acizi huminici bruni şi acizi huminici cenuşii.

2) *Fracţiunea insolubilă* este reprezentată de humină*.

*Acizii fulvici*, neuniformi din punct de vedere calitativ, reprezintă stadiul iniţial de transformare a produşilor intermediari rezultaţi din descompunerea masei reziduale organice. Au greutate moleculară mică (2 000 — — 8 000 dal) şi o structură chimică heterogenă. Conţinutul în C este de 42—

* Metodele de extracţie şi fracţionare a constituenţilor humusului sînt diferite şi nu unanim acceptabile. La fel terminologia. Specialiştii în domeniul ecopedologiei (Chiriţă, 1974) păstrează distincţia dintre acizii humici şi acizii huminici. Cei din domeniul ecologiei microorganismelor şi microbiologiei solului utilizează termenul generic de acizi humici.

—52%. Au un raport mai mare O/C decît acizii huminici și o proporție mai mare de grupări acide per unitate de greutate. Puțin reprezentați în solurile neutre și slab acide, pot forma în orizontul cu humus pînă la 70% în solurile de tip podzolic (Chiriță, 1974). În cernoziom reprezintă 15—20%.

*Acizii huminici* sînt constituenți majori ai humusului din solurile fertile. Solubili în alcali, insolubili în apă, prezintă un grad înalt de polimerizare (g.m. 50 000 — 100 000 dal). Se pot forma prin polimerizarea acizilor fulvici. Au capacitatea de a forma humați solubili cu $NH_4^+$ și cu alcalii, dar sînt insolubili sau greu solubili cu Ca, Mg, Fe și Al.

În funcție de proprietățile lor chimice aparțin la trei categorii:

1) *acizii himatomelanici* — precursori ai humusului, apropiați de acizii fulvici;

2) *acizii huminici bruni*, cu un conținut în C de 50—60% și în N de 3—5%;

3) *acizii huminici cenușii*, cei mai valoroși și mai puternic polimerizați (g.m. 100 000 dal), avînd culoarea neagră-cenușie, un conținut în C de 58—62% și în N de 7,5%.

*Huminele*. După Burns (1983) nu reprezintă o clasă de compuși chimici aparte, ci sînt complexe macromoleculare de acizi fulvici și huminici, puternic legate de materiale minerale. Insolubile în alcali, huminele formează fracțiunea cea mai stabilă a solului. Ele marchează stadiul final al biosintezelor humice. Unele studii de datare cu $^{14}C$ au demonstrat pentru acizii fulvici o vechime de 550 de ani, pentru acizii huminici de 780 de ani, iar pentru humine de 1 130 de ani (Russell, 1971). După Burns (1983), huminele pot avea între 2 000 și 5 000 de ani.

Huminele dau culoarea caracteristică (brun închis spre brun-negru) a straturilor superficiale ale solului.

Datorită proprietăților fizicochimice și biochimice, huminele au o importanță esențială pentru viața din sol. O particularitate deosebită decurgînd din structura lor coloidală este că au o suprafață mai mare decît a mineralelor argiloase, însumînd circa 1 000 $m^2/g$. În funcție de structura lor chimică, de suprafața și de valoarea de pH a solului, huminele au fie sarcini electronegative, fie electropozitive grație cărora pot realiza multe procese de legare chimică și de schimb.

Materialele humice (ca și alte molecule organice din sol, cum sînt polizaharidele) sînt cel mai adesea asociate intim cu argilele pentru a forma *complexe organominerale* (Theng, 1979). Spre exemplu, acizii humici pot fi legați de argile di- și polivalente. La valori de pH acid, acizii fulvici cu g.m. mică pot fi adsorbiți în spațiile dintre straturile rețelei de argile expandabile.

Huminele sînt, de asemenea, asociate intim cu argilele coloidale. Asocierea polimerilor organici cu argilele coloidale are o influență enormă pentru proprietățile de suprafață ale complexului organo-mineral rezultat. „Învelișul" humic poate masca situsurile potențial reactive de pe suprafața argilelor sau poate împiedica accesul la zonele interlamelare ale acestora (Burns, 1983). Fiind continuu degradați, sintetizați și polimerizați, coloizii humici au proprietăți de schimb ionic.

*Structura chimică a humusului* nu este definită exact, fapt care explică numeroasele controverse și revizuiri conceptuale. Există chiar tendința de a considera că materialele humice nu au o structură chimică definită, deoarece sînt polimeri asamblați neregulat.

Un model structural acceptabil pentru structura acizilor humici, în stadiul actual al cunoștințelor a fost propus de Stevenson (1976) (fig. 234).

El are la bază existența unei porțiuni centrale (,,Core''), constînd din cicluri aromatice, heterociclice și chinoidale condensate, conectate și interconectate prin legături carbon — carbon, amino și azo. Ciclurile poartă o serie de grupări funcționale de tip carboxil, hidroxil, fenolic și carbonil. În sfîrșit, de porțiunea centrală a moleculei sînt legate glucide, aminoacizi și

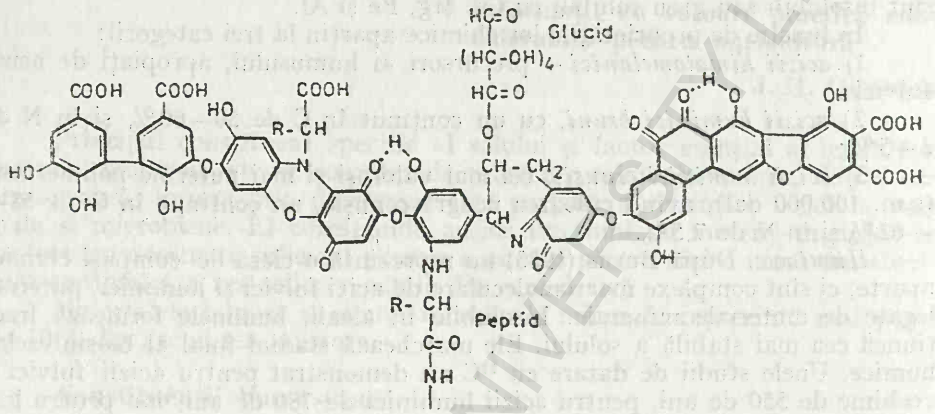



Fig. 234. — Structura chimică probabilă a acidului humic (după Stevenson, 1976).

fenoli, care formează alte interconexiuni. În felul acesta, rezultă o structură complexă tridimensională, ca un burete, care absoarbe ușor apa, ionii și moleculele organice într-un mod reversibil și care, în plus, poate lega chimic de grupările sale funcționale diferiți compuși organici naturali sau îi poate ,,absorbi'' în structura sa.

Aceste fenomene se produc și cu enzimele active, care frecvent sînt găsite legate de humus în sol, dar probabil și cu mulți produși de sinteză. Datorită acestei structuri tridimensionale, polimerii humici se pot expanda (gonfla), expunînd regiuni extinse ale suprafeței lor, care pot influența considerabil interacțiunile cu enzimele, cu microorganismele și cu diferite substraturi. Din acest punct de vedere se aseamănă cu rețeaua argilelor expandabile a căror importanță pentru activitățile din sol o egalează.

### Tipurile de humus

În funcție de particularitățile lor fizico-chimice și de formare au fost descrise trei tipuri de humus:

**Humusul de tip mull** (,,pămîntos''), fin, slab acid, de culoare brună, închis sau negru, este caracteristic mediilor bine aerate. Este rezultatul unor procese de humificare foarte înaintată sau de humificare completă a substanțelor organice. În geneza lui, un rol important revine viermilor de pămînt, foarte numeroși în solurile respective, care au mărunțit, ingerat și digerat parțial resturile vegetale înainte de a fi humificate. În acest proces, materia organică originară a suferit modificări complexe care au favorizat acțiunea

de degradare și transformare finală de către bacterii (inclusiv actinomicete și fungi).

Humusul de tip mull se formează în condiții de climă favorabilă activităților biologice intense, în solurile bogate în substanțe nutritive. Este caracteristic solurilor fertile, celor de sub pășuni vechi și păduri de foioase.

**Humusul de tip mor** (humusul brut) este un tip de humus imperfect, rezultat al unui proces de descompunere lentă, dominată de fungi datorită unei mezofaune puțin numeroasă. Este caracteristic solurilor puțin active, sărace în elemente nutritive, în care provine prin degradarea fermentativă și humificarea litierei.

Se formează frecvent în solul pădurilor de rășinoase (pin și molid) prin degradarea acelor de conifere. Conține resturi organice puțin mărunțite, transformate în acizi organici, polifenoli, produși de descompunere solubili și numai puține substanțe polimerizate.

**Humusul de tip moder** are caracter intermediar. Conține predominant componente coprogene, relativ grosiere de la artropode amestecate cu resturi de țesuturi vegetale (moder grosier) sau mai fine (Chiriță, 1974). Huminele sînt în cantități mici.

**Cantitatea de humus din sol.** Materialele humice reprezintă mai puțin de 10% din greutatea solurilor (Atlas și Bartha, 1987).

Kononeva și Tiurin (1968), citați de Chiriță (1974), au găsit cele mai mari proporții în solul de tip cernoziom gros de silvostepă cu vegetație heteroierboasă (9—10%), în cernoziomul ordinar 7—8%, în solul cenușiu de pădure 4—6%, iar în cel puternic podzolit 2,5—3%.

Eliade (1981) apreciază că în țara noastră, solurile cele mai bogate în humus sînt cernoziomurile din zona de nord (112—113 t/ha). Urmează cernoziomurile sudice (84—103 t/ha). Solurile de tip podzol nu depășesc 80 t/ha, iar nisipurile au 25 t ha.

## HUMIFICAREA

Procesul de humificare este foarte puțin cunoscut. Pe plan global, el reprezintă o situație intermediară între procesele de reciclare imediată și rapidă, care determină degradarea resturilor de substanțe organice (în special vegetale) ajunse în sol și cele de depunere de combustibili fosili.

În prezent există un acord general în a aprecia că cel puțin marea majoritate a humusului este de origine biogenă și corelat cu procesul de lignoliză. După cum s-a demonstrat, 18—30% din țesuturile lemnului matur sînt compuse din lignină, care formează împreună cu celuloza și hemicelulozele pereții celulelor vegetale, un substrat rezistent, ferm și greu degradabil (Sarkanen, 1963). Cu toate acestea, în 6—8 luni, 60—75% din lignina diferitelor substraturi naturale este degradată de fungii putregaiului alb (vezi cap. *Degradarea microbiană a ligninelor)*.

Paralel cu acest proces, în strînsă apropiere fizică are loc procesul de formare a humusului. Detaliile procesului de humificare sînt greu de descifrat. În primul rînd, pentru că nici structura ligninelor și nici cea a humusului nu au fost elucidate. Ceea ce se știe cert este că, pe lîngă caracterul de macromolecule foarte complexe, humusul prezintă un înalt grad de variabilitate. Procesul de humificare evoluează extrem de lent, substanțele humice avînd vîrste apreciate între 20 și 5000 de ani și, în plus, în cursul acestor perioade ele sînt continuu reciclate (mineralizate) și resintetizate. Russell (1971), în

experiențe de datare cu $^{14}C$, a stabilit vîrste de 550 de ani pentru acizii fulvici, 780 pentru acizii huminici și 1 130 de ani pentru humine.

Oglesby, Christman și Driver (1967) enumeră trei căi posibile de conversie a ligninei în humus:

1) Humificarea materialului solid rămas după fragmentarea macromoleculelor de lignină de către microorganisme;

2) Polimerizarea directă sau enzimatică extracelulară a produșilor de degradare reactivi (fenilpropanoid, benzil) și formarea de macromolecule noi, asemănătoare humusului;

3) Formarea humusului ca un produs direct al unor produși secundari ai metabolismului microorganismelor (deci prin resinteza compușilor reactivi în celule, excreția lor și polimerizarea în mediu).

Humificarea, ca proces secundar ligninolizei, evoluează într-o serie de etape succesive în care procesele de descompunere se însoțesc de transformarea unei părți din materialele de bază prin sinteză și polimerizare (fig. 235).

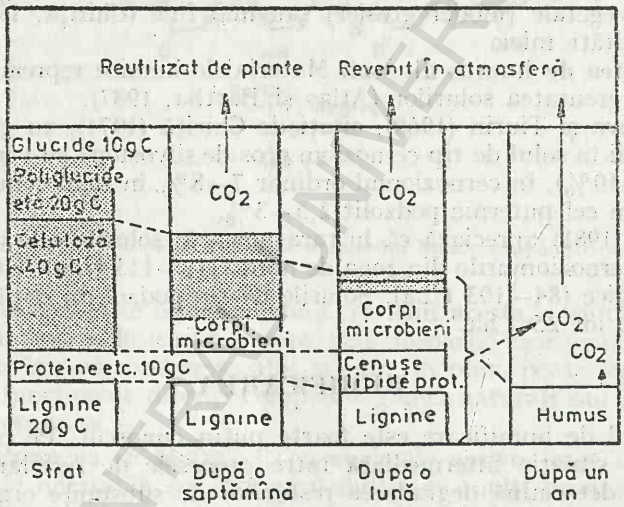



Fig. 235. — Reprezentarea schematică a căilor de formare a humusului, prin procesele de biodegradare a țesuturilor vegetale și sinteze (după Umbreit, 1962).

Structura de bază reprezentată de ciclurile aromatice care formează porțiunea centrală a moleculei de acid humic poate avea originea în produșii de degradare a ligninei sau poate fi sintetizată *de novo* de unele microorganisme de la alte substraturi. În acest proces nu este exclusă înglobarea unor resturi aromatice provenite din substanțe de sinteză cum sînt unele pesticide. În aceste cazuri, unele dintre ele își păstrează caracterul xenobiotic cînd sînt legate de humus, ca și după ce sînt eliberate prin biodegradare din matricea humică înconjurătoare.

Procesul de humificare evoluează extrem de lent și implică numeroase reacții de transformare (carboxilări, decarboxilări, oxidări, hidroxilări) și polimerizări mediate de enzime (laccaze, fenoloxidaze, peroxidaze etc.) (fig. 236). Policondensatul final poate diferi de la un sol la altul, așa cum diferă și argilele (Burgess, 1965).

În absența activității biologice, în condiții de aciditate puternică, temperaturi scăzute, umiditate și materie organică cu conținut scăzut în N are loc humificarea abiologică, foarte lentă, imperfectă, având drept rezultat producerea de turbă* și humus brut (Chiriță, 1974). În aceste cazuri, predomină compușii humici cu grad de polimerizare redus (acizi fulvici).

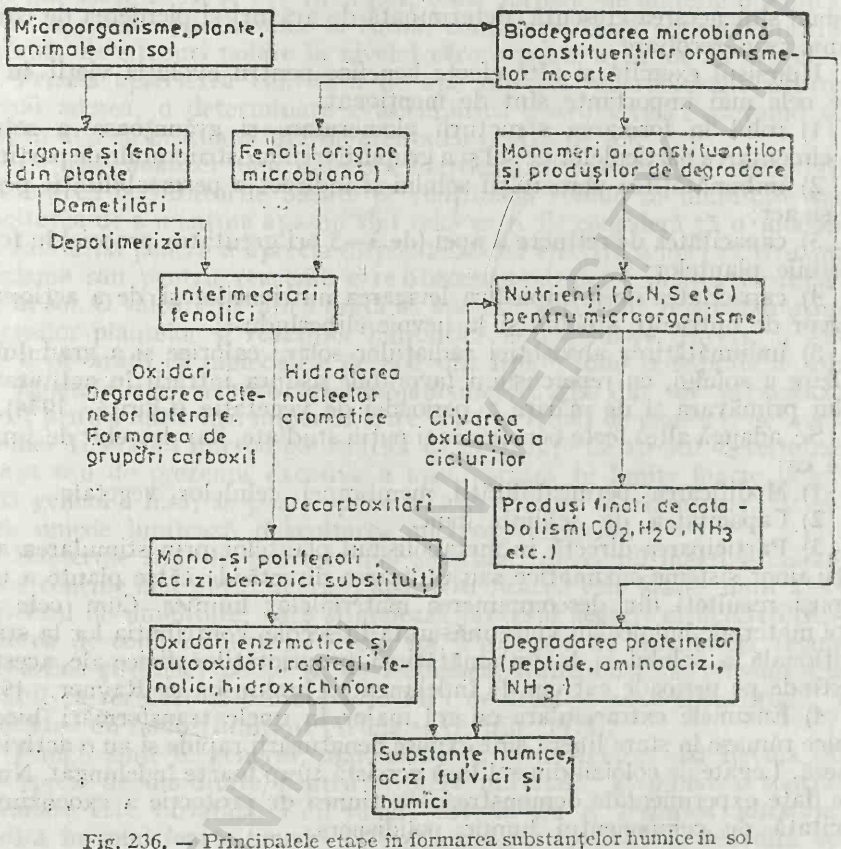



Fig. 236. — Principalele etape în formarea substanțelor humice în sol (după Flaig, 1973).

## ROLUL HUMUSULUI ÎN NATURĂ

Humusul reprezintă una dintre cele mai răspîndite și mai abundente materii organice din sol. El asigură dezvoltarea microorganismelor cu toate funcțiile lor specifice și reprezintă factorul major al fertilității solului, prin asigurarea permanentă a nutrienților în forme accesibile plantelor. Această funcție este consecința faptului că humusul este permanent expus activităților de degradare efectuate de microorganisme și datorită cărora materialele

* *Turbă* — aglomerări masive de resturi organice, saturate cu apă, puțin transformate prin procese de descompunere și humificare lentă, în condiții de anaerobioză permanentă. În funcție de natura vegetației, a conținutului în apă și a substanțelor componente poate fi: *eutrofă*, *mezotrofă* sau *oligotrofă* (Chiriță, 1974).

humice sînt într-o stare de echilibru dinamic: descompunerea lor treptată este compensată prin resinteză.

Atlas şi Bartha (1987) semnalează faptul că în solul virgin redat agriculturii, conţinutul în humus scade regulat în primii 40—50 de ani, echilibrîndu-se, eventual, la o valoare mult mai mică. Cauzele probabile ale acestui fenomen sînt aerarea crescută, determinată de arături şi pierderea de carbon organic prin recoltare.

Humusul exercită şi alte efecte benefice pentru evoluţia vieţii în sol. Între cele mai importante sînt de menţionat:

1) rolul în formarea structurii glomerulare şi grăunţoase a solului, prin cimentarea particulelor de sol şi a grupurilor microstructurale de particule;

2) îmbunătăţirea porozităţii solului şi indirect a permeabilităţii pentru apă şi aer;

3) capacitatea de reţinere a apei (de 3—5 ori greutatea proprie) în forme accesibile plantelor;

4) capacitatea de a împiedica levigarea nutrienţilor şi de a acţiona ca rezervor de nutrienţi, stocînd şi la nevoie eliberîndu-i;

5) îmbunătăţirea absorbţiei radiaţiilor solare calorice şi a gradului de încălzire a solului, cu repercusiuni favorabile asupra intrării în activitate a solului primăvara şi de mărire a perioadei de vegetaţie (Chiriţă, 1974).

Se adaugă alte efecte benefice mai puţin studiate, dar deosebit de importante ca:

1) Modificarea permeabilităţii membranei celulelor vegetale.

2) Capacitatea de schimb ionic.

3) Participarea directă în metabolismul plantelor prin stimularea activităţii unor sisteme enzimatice sau utilizarea directă de către plante a unor compuşi rezultaţi din descompunerea materialelor humice. Cum cele mai multe materiale humice au viaţa măsurată în secole, contribuţia lor la starea nutriţională a solului şi la îmbunătăţirea proprietăţilor fizice ale acestuia se extinde pe perioade extrem de îndelungate (Jenkinson şi Rayner, 1977).

4) Enzimele extracelulare cu rol major în unele transformări biogeochimice rămase în stare liberă sînt expuse denaturării rapide şi au o activitate efemeră. Legate de coloizii din sol însă persistă timp foarte îndelungat. Numeroase date experimentale demonstrează acţiunea de protecţie a exoenzimelor exercitată de componentul humic polidispers.

## FACTORII DE MEDIU CARE INFLUENŢEAZĂ NATURA, NUMĂRUL ŞI ACTIVITATEA MICROORGANISMELOR

### Umiditatea

Apa şi umiditatea asigurată de ea sînt esenţiale pentru creşterea, activitatea, supravieţuirea şi în cazul speciilor sporogene pentru germinarea sporilor diferitelor categorii de microorganisme.

Fiind derivată din precipitaţiile atmosferice, apa este foarte variabilă cantitativ şi, în consecinţă, umiditatea solului este expusă la mari fluctuaţii sezoniere şi chiar diurne. Parte din ea (apa gravitaţională) se scurge sau se infiltrează datorită gravitaţiei. Numai o parte este reţinută contra atracţiei gravitaţionale şi poate fi utilizată de sistemele biologice. Acest proces este facilitat de marea afinitate a mineralelor argiloase şi a materiei organice pentru moleculele de apă, care le permite să reţină umiditate chiar în solu-

rile uscate de aer. Apa reținută în spațiul interlamelar al rețelelor argiloase expandabile poate ocupa pînă la patru straturi moleculare și poate fi îndepărtată complet numai prin suprauscare (Burns, 1983). Apa este, de asemenea, reținută, dar mai puțin ferm, pe suprafața silicaților neexpandabili, ca și pe oxizii hidratați de Al și Fe. În sfîrșit, toate formele de materie organică din sol, de la substanțele humice la turbă, conțin, pe lîngă regiunile hidrofobe, un număr de situsuri polare la nivelul cărora poate avea loc adsorbția apei.

Pentru aprecierea cantității de apă din sol, microbiologii utilizează, cel mai adesea, o determinare cvasiempirică gravimetrică exprimînd conținutul în apă ca procente față de greutatea probei de sol.

Pe baza analizei unor date din literatura de specialitate, Burns (1983) consideră că măsurătorile bazate pe conținutul solului în umiditate sau pe capacitatea de a menține apa nu sînt relevante. El consideră că o modalitate mult mai utilă pentru a aprecia disponibilitatea efectivă a apei pentru microorganisme sau pentru reacțiile care o necesită este determinarea tensiunii apei (pF) în sol. O valoare pF mică arată că apa este accesibilă microorganismelor, rădăcinilor plantelor și reacțiilor hidrolitice extracelulare. Invers, o valoare mare a pF arată că moleculele de apă sînt legate solid la suprafața solului.

**Efectele apei asupra microorganismelor.** Apa din sol acționează ca solvent pentru nutrienții minerali, care vor fi preluați de plante și de microorganisme. Toleranța microorganismelor ca grup față de stresul determinat de absența sau de prezența excesivă a apei variază în limite foarte largi. Ca regulă generală însă, se poate spune că atît solurile foarte uscate, cît și cele foarte umede limitează dezvoltarea microorganismelor.

Bacteriile sînt, în general, mai sensibile, devenind inactive cînd solul argilos conține mai puțin de 12% apă. Nitrificarea este foarte mult afectată de excesul de umiditate, care stimulează procesul negativ de denitrificare, cu pierderea de compuși utili ai N din sol. Producția de metaboliți secundari (antibiotice și altele) poate fi, de asemenea, influențată de tensiunea apei, probabil ca rezultat al comutării la faza de creștere postexponențială, cînd apa devine un factor limitant (Wong și Griffin, 1974).

Fungii sînt, în general, mai rezistenți la uscăciune, dar nevoia diferitelor specii de umiditate pentru creștere micelială, germinarea sporilor și diseminare este variabilă. Unii fungi *(Mortierella* și *Pythium ultimum)* se dezvoltă în solul foarte umed. Alții *(Curvularia ramosa)* se dezvoltă foarte lent și cu o morfologie anormală în solul cu exces de umiditate datorită efectului inhibitor al absenței schimbărilor de gaze. În sfîrșit, alți fungi ca *Mucor, Aspergillus* și *Penicillium* sp.) sînt găsiți și în solurile foarte uscate, în timp ce *Fusarium, Trichoderma* și *Gliocladium* sînt puțin afectate de variațiile umidității.

Acest comportament diferit determină natura populației fungice în natură și, în parte, explică de ce unele boli sînt limitate la anumite regiuni. S-a observat o anumită selectivitate în raport cu fazele ciclului de viață: spre exemplu, la *Fusarium solani* forma *specialis pisi,* germinarea este rapidă și masivă cînd conținutul în apă este de 8,7%. În schimb, în prezența unor cantități mai mari de apă, tubii germinativi se lizează. În unele cazuri, miceliul fungic este ancorat într-o regiune mai veche a lungimii sale, în care apa este disponibilă, ceea ce permite transportul acesteia intrahifal spre regiunea apicală a hifei, care poate să crească într-un mediu uscat. Figura 237 prezintă efectul apei asupra extensiei hifelor unor fungi, evidențiind diferențele dintre speciile individuale.

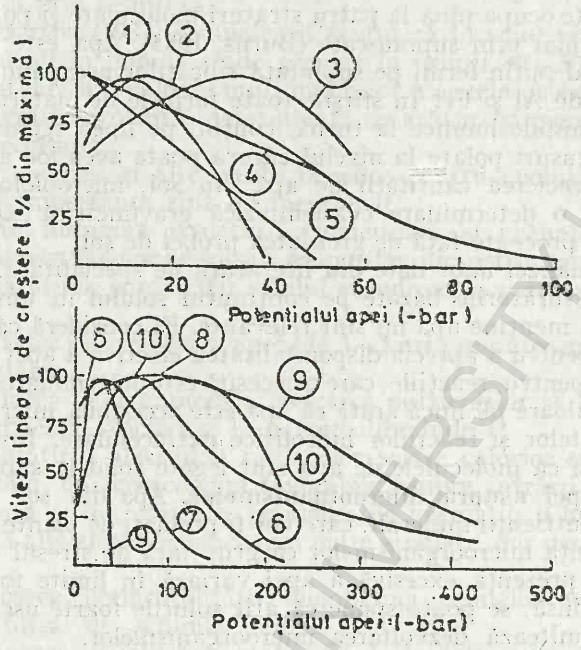



Fig. 237. — Efectul potențialului apei asupra vitezei lineare de extindere a 10 specii de fungi. 1. *Phycomyces niteus* și *Phytophtora cinnamomi*. 2. *Fusarium culmorum* izolat din S.U.A. 3. *Fusarium culmorum* (izolat din Australia). 4. *Cochliobolus sativus*. 5. *Ophiobolus graminis* și *Rhizoctonia solani*. 6. *Aspergillus niger*. 7. *Aspergillus flavus*. 8. *Aspergillus amstelodami*. 9. *Xeromyces biosporus*. 10. *Stereum frustulosum* (după Griffin, 1966).

Prezența apei în sol afectează deplasarea microorganismelor între pori, de-a lungul rădăcinilor și în jurul resturilor vegetale. Bacteriile se răspîndesc rapid pe diferite suprafețe solide numai cînd grosimea peliculei de apă este comparabilă ca grosime cu mărimea celulei bacteriene.

## Atmosfera solului

Aerarea reprezintă procesul deosebit de important pentru viața din sol, prin care gazele produse sau consumate sub suprafața terestră sînt schimbate cu cele din aerul atmosferic (Letey, 1965). Ea se realizează datorită faptului că porii din sol care nu sînt ocupați de apă conțin gaze ce formează atmosfera solului. Ca și lipsa de nutrienți, lipsa de aerare poate acționa ca un factor limitant pentru creșterea anumitor microorganisme.

Compoziția atmosferei solului (la interfața litosferă/atmosferă) variază foarte mult la diferitele tipuri de sol. Existența ei este asigurată de spațiile poroase din sol și, de aceea, este cu atît mai mare cu cît spațiile disponibile sînt mai mari. Atmosfera din sol poate fi îndepărtată prin compactare (tasare) cînd apropierea dintre particulele de sol blochează accesul aerului sau cînd

porozitățile sînt ocupate de apă, reziduuri organice sau fragmente de țesuturi vegetale.

Atmosfera solului nu este identică celei de deasupra pămîntului sau cu cea situată imediat sub suprafață. Concentrația ei în $O_2$ este mai redusă, iar cea a $CO_2$ este de 10—100 de ori mai mare. Distribuția celor două gaze în sol, influențată de fenomenele de difuzie și de respirația microorganismelor, este inegală în așa fel încît unele zone pot fi puternic aerobe, iar altele sînt anoxice. Sub acest raport, solul nu apare ca un întreg, ci ca o colecție de microhabitate în care cele două condiții — de aerobioză și anaerobioză — coexistă în teritorii foarte apropiate. Concentrația oxigenului scade cu adîncimea, în timp ce concentrația $CO_2$ în coloana de sol crește în aceleași condiții (fig. 1).

Situația este reflectată și în natura microorganismelor prezente. Frecvența bacteriei *Azotobacter* scade cu adîncimea, în timp ce *Clostridium* devine mai abundent. Agregatele de sol cu raza mai mare de 3 mm, deși au o suprafață intens aerobă, sînt anaerobe în regiunea centrală (Greenwood, 1967). Faptul că solul conține un număr mare de microorganisme aerobe, aparținînd unei mari diversități metabolice arată marea importanță a acestui element pentru viața din sol. Într-un sol bine aerat, procesele efectuate de microorganismele care necesită $O_2$ evoluează foarte rapid și au consecințe importante, în special, în mineralizarea substanțelor organice, în circulația azotului, a carbonului etc.

Este puțin probabil că datorită modului în care aerul circulă prin porozitățile solului, concentrația oxigenului să satisfacă exigențele tuturor organismelor din sol, cu atît mai mult cu cît Clark și Kemper (1967) au demonstrat că în solul care conține plante nevoia de oxigen este de trei ori mai mare decît în cel necultivat. Ei apreciază că aproximativ jumătate din cantitatea de $O_2$ necesară rădăcinilor este consumată de microorganismele de pe suprafața acestora. Lipsa oxigenului sau prezența peste o anumită concentrație a $CO_2$ inhibă creșterea rădăcinilor al căror apex este foarte sensibil la lipsa de $O_2$. Fungii, inclusiv cei patogeni (cu excepția celor cîteva specii acvatice care trăiesc în mîl și în ape stagnante) sînt foarte aerobi și au nevoie de oxigen atît pentru creșterea vegetativă, cît și pentru sporulare. Stolzy și van Gundy (1968) au demonstrat că *Thielaviopsis basicola* prezintă mai mulți spori germinați și au tubi germinativi mai lungi cînd oxigenul este în proporție de 100% decît de 21%. Efectele nocive ale aerării insuficiente a solului sînt adesea date nu atît de lipsa de $O_2$, cît de excesul de $CO_2$, care inhibă sporularea la concentrații mai mici decît cele necesare pentru a inhiba sau stopa creșterea vegetativă (Hawker, 1966).

Conținutul în $O_2$ al solului este important întrucît determină tipul de metabolism care poate avea loc și natura transformărilor efectuate de microbiota indigenă. În condițiile în care $O_2$ este deficitar vitezele multor procese microbiene sînt reduse și unele pot fi chiar eliminate. În solurile deficitare în oxigen apar alte gaze ca, de exemplu, $N_2O$ și $N_2$, rezultate din denitrificare, $CH_4$ din metanogeneză, $H_2S$, din reducerea anaerobă a sulfatului, precum și diferiți inhibitori organici, ioni feros, manganos etc.

### Temperatura

Este un factor variabil în straturile de la suprafața solului, putînd să crească datorită razelor calorice solare pînă la 55°C în regiunile temperate, 70°C la tropice și 88°C în Valea Morții (Death Valley) din California.

Prezintă variații diurne, cu scăderi rapide noaptea, ca și variații sezoniere și în funcție de latitudine și altitudine.

Creșterile și variațiile de temperatură sînt mai mari în solurile lipsite de vegetație. Prezența acesteia, ca și a resturilor vegetale formează straturi protectoare care reduc variațiile mari.

Temperatura solului variază, de asemenea, în funcție de conținutul în apă și de adîncime.

### pH

Solurile au, în general, valori de pH cuprinse între 4,0 și 8,5. Deși dispun de un sistem tampon complex, dependent de capacitatea de schimb ionic a argilelor și a materiei organice coloidale, de cantitatea de carbonați insolubili și de hidroxizi prezenți (în special de Al), valorile de pH care, în anumite limite, determină natura microorganismelor prezente, sînt influențate de activitatea metabolică a acestora. În anumite condiții, microorganismele pot crea chiar condiții dezavantajoase pentru creșterea plantelor.

Degradarea litierei poate produce un pH acid în straturile de suprafață ale solului, în timp ce orizonturile inferioare pot fi alcaline. Reducerea nitratului la $N_2$ și a sulfatului la sulfuri în condiții anoxice favorizează alcalinizarea solului. În schimb, producerea de $CO_2$ în cursul respirației mărește aciditatea, proporțional cu logaritmul presiunii parțiale a $CO_2$ (Lynch, 1979). În general, solurile de sub vegetația de conifere sînt acide, în timp ce cele din regiunile uscate de pășune sînt alcaline.

Valorile de pH pot prezenta variații în funcție de climat, de anotimp și de natura culturilor precursoare determinării. Ca și în cazul altor factori de mediu, uneori, variațiile de pH sînt întîlnite la distanțe foarte mici. Determinarea lor în sol este, în general, greu de efectuat, mai ales la suprafața particulelor, unde enzimele extracelulare adsorbite pot acționa la pH diferit de cel al restului solului.

### Anotimpul

Este un factor ecologic variabil secundar, în sensul că este definit de variațiile unor factori primari (temperatură, ploi, depuneri de resturi de recoltă, prezența rădăcinilor vii sau moarte etc.).

În regiunile temperate, numărul maxim de microorganisme este atins primăvara, datorită creșterii temperaturii și faptului că resturile organice depuse toamna și iarna devin accesibile prin descompunere.

A doua perioadă de dezvoltare maximă este toamna, sub influența umidității și a resturilor vegetale depuse în cantități mari.

Vara, numărul microorganismelor scade datorită temperaturii ridicate și uscăciunii, iar iarna datorită frigului care determină încetinirea sau suprimarea activităților biochimice.

### Adîncimea

Reprezintă un factor ecologic secundar, care influențează în mod evident densitatea microorganismelor prin efectele concentrației $O_2$ și $CO_2$, ale nutrienților organici și anorganici, umidității etc. Studiile referitoare la frecvența diferitelor categorii de microorganisme în coloana de sol indică o scădere bruscă cu adîncimea, în raport cu numărul mare prezent la suprafață (tabelul nr. 43).

*Tabelul nr. 43*

**Distribuția microorganismelor în diferitele orizonturi ale profilului unui sol**
(după Stark, 1942)

| Orizontul | Adîncimea (cm) | Nr. microorganisme × $10^3$/g de sol | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Bacterii | | | Fungi | Alge |
| | | Aerobe | Anaerobe | Actinomicete | | |
| $A_1$ | 3— 8 | 7 800 | 1 950 | 2 080 | 119 | 25 |
| $A_2$ | 20— 25 | 1 800 | 379 | 245 | 50 | 5 |
| $A_2 + B_1$ | 35— 40 | 472 | 98 | 49 | 14 | 0,5 |
| $B_1$ | 65— 75 | 10 | 1 | 5 | 6 | 0,1 |
| $B_2$ | 135—145 | 1 | 0,4 | — | 3 | — |

## MICROBIOTA DIN SOL

**„Ca rezultat al structurii comunității lor, populațiile de microorganisme din sol prezintă un spectru ieșit din comun de proprietăți metabolice și sînt rezistente la tot felul de perturbări naturale sau antropogene"**

R. G. BURNS

Solul este, în general, un mediu potrivit pentru dezvoltarea microorganismelor, fapt ilustrat atît de numărul, cît și de diversitatea lor mult mai mari decît în mediul acvatic. Datorită heterogenității sale, poartă populații de microorganisme cu particularități biologice și biochimice foarte diferite, care competiționează pentru concentrații fluctuante de nutrienți, inegal distribuiți și frecvent insolubili și ca răspuns la fluctuații de pH, tensiune de oxigen, concentrație ionică, umiditate relativă etc. Micropopulațiile din sol sînt alcătuite de bacterii (eubacterii, actinomicete, cianobacterii), microfungi, alge și protozoare.

Winogradski (1925, 1949) a propus o diferențiere ecologică în două categorii majore:

**Microorganismele autohtone** (indigene, permanente sau constante) sînt cele mai numeroase și sînt caracteristice unui anumit tip de sol. Ele sînt adaptate la viața în solul „normal", adică în solul care nu conține substanțe organice în curs de fermentație sau de putrefacție.

Microorganismele indigene (bacterii, inclusiv actinomicete, ascomicete și basidiomicete) desfășoară o activitate lentă și continuă, utilizînd nutrienții prezenți în mod normal în sol, inclusiv substanțe organice relativ stabile și mai refractare la degradare, cum sînt substanțele humice. Dezvoltarea lor nu este condiționată de surse de nutrienți sau de energie din afara solului și, de aceea, nu sînt expuse la fluctuații numerice semnificative.

**Microorganismele zimogene** (temporare sau de fermentație) au o activitate periodică, intermitentă, cu faze de activitate și de repaus. Nu pot utiliza substanțele complexe din sol și se dezvoltă pe substanțe organice ușor utilizabile, provenite de la exterior, respectiv din resturi vegetale, excrete și resturi animale etc.

Puțin numeroase în mod normal, microorganismele zimogene se dezvoltă luxuriant după adăugarea substanțelor organice exogene, pentru a reveni numeric la normal cînd concentrația nutrienților accesibili a diminuat.

Fără a diminua semnificația acestei clasificări, studiile de microbiologia solului au demonstrat dificultatea separării categorice a celor două categorii de microorganisme. Unii cercetători consideră că microorganismele zimogene intră în sol odată cu resturile organice pe care le degradează, în timp ce alții (Atlas și Bartha, 1987) le consideră ca microorganisme heterotrofe autohtone, cu anumite particularități fiziologice și biochimice, prezente permanent în stare latentă în sol. Ei limitează termenul de alohton la patogenii pentru plante, animale și om, care ajung în sol cu țesuturile vegetale infectate sau bolnave, cu apele reziduale, dejecțiile și cadavrele animalelor bolnave. Ele formează *microbiota de tranziție*, deoarece, în general, nu găsesc în sol condiții de multiplicare, ci numai de supraviețuire temporară, în funcție de factorii de mediu și de eventualitatea întîlnirii cu specia-gazdă. Numai puține specii patogene ca, de exemplu, *Clostridium tetani* pot persista îndelungat în sol.

Analiza datelor cantitative privind numărul, biomasa și activitatea diferitelor tipuri de microorganisme furnizează date foarte contradictorii. Pe lîngă dificultățile inerente determinărilor de acest gen, într-un mediu foarte heterogen, cum este solul, un factor de eroare semnificativ este introdus de diferiții cercetători care raportînd, spre exemplu, biomasa la hectar iau în calcul, după caz, un strat de sol adînc de 15, de 20 sau de 25 cm. Datele obținute se referă la greutatea umedă sau uscată a microorganismelor sau a solului, adesea fără a menționa acest lucru. Oricum, există un fapt necontestat și anume că numărul cel mai mare revine, totdeauna, bacteriilor, dar uneori biomasa fungilor poate fi mai mare datorită structurii de tip micelial (tabelul nr. 44).

*Tabelul nr. 44*

**Numărul și biomasa diferitelor tipuri de microorganisme în cei 15 cm superiori ai unui sol agricol** (după Berkeley, 1971)

| Microorganismele | Numărul per gram de sol/greutate uscată | Biomasa ($g/m^2$) |
|---|---|---|
| Eubacterii | $10^3$ | 160 |
| Actinomicete | $10^5 - 10^6$ | 160 |
| Fungi | $10^5$ | 200 |
| Alge | $10^4 - 10^5$ | 32 |
| Protozoare | $10^4$ | 38 |

Determinările numerice ale diferitelor categorii de microorganisme au evidențiat dependența lor de natura solului, de orizontul și de adîncimea de la care au fost recoltate, de particularitățile de umiditate, de pH, de conținutul în substanțe organice și de gradul de oxigenare (tabelul nr. 41).

Ele au evidențiat o serie de particularități generale între care menționăm:

— Bacteriile, de altfel cel mai mult studiate, se dezvoltă activ într-un număr imens de habitate, cu dimensiuni milimetrice sau mai ales micrometrice, în timp ce în restul solului doar supraviețuiesc. Ele formează microcolonii (adeseori conținînd mai puțin de 10 celule) pe suprafața particulelor de sol (fig. 238). Natura particulelor are un rol deosebit de important. Creșterea este mult mai importantă pe particulele de humus, pe diferite materiale organice decît pe cele de nisip.

— Unele minerale argiloase, ca montmorillonitul, stimulează viteza de creștere a bacteriilor, dar inhibă creșterea lineară a fungilor. Unele microorganisme mobile (alge, protozoare) se dezvoltă în „filmele" de apă care acoperă diferiții constituenți ai solului.

— Factorul variabil cu repercusiuni majore pentru dezvoltarea microorganismelor în sol este concentrația nutrienților.

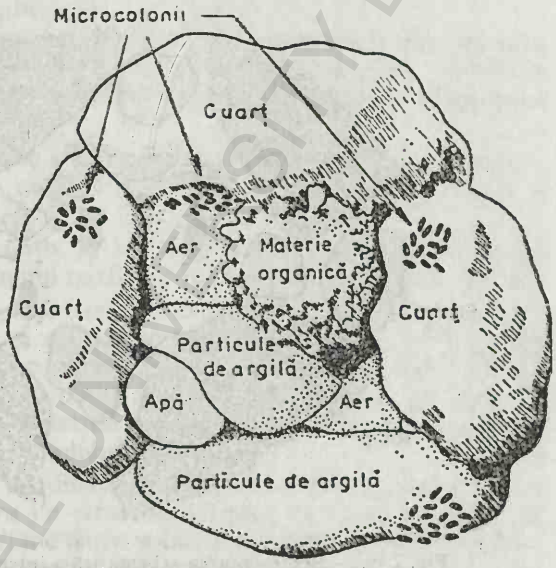



Fig. 238. — Reprezentarea schematică a unui agregat de sol, evidențiind prezența mai multor microhabitate și distribuția discontinuă, sub formă de microcolonii, a bacteriilor. Figura evidențiază, de asemenea, prezența apei și a aerului în spațiul reprezentat de pori (după Brock, 1979).

Cantitatea de materie organică și în mare măsură calitatea ei reprezintă un factor critic pentru dezvoltarea bacteriilor heterotrofe și a fungilor (Campbell, 1977). Cea mai mare parte este insolubilă și inegal răspîndită și, în consecință, adesea, numărul bacteriilor și al fungilor este corelat cu distribuția ei.

Pentru alge și bacteriile autotrofe este esențială concentrația nutrienților anorganici. Unele substanțe organice chiar pot inhiba dezvoltarea algelor, dar există și excepții ca, de exemplu, alga *Prasiola crispa*, care se dezvoltă masiv în habitate bogate în substanțe organice, cum sînt depozitele de guano.

— Abundența protozoarelor este corelată cu numărul bacteriilor, deși protozoarele saprozoice depind direct de prezența și de cantitatea de materie organică în mediu.

— Viața microorganismelor din sol este, în mare măsură, influențată de fenomenele de adsorbție.

Microorganismele, ca și nutrienții organici sînt frecvent adsorbiți și concentrați pe anumite particule. Astfel, bacteriile sînt frecvent adsorbite

pe suprafața mineralelor argiloase și a coloizilor organici, în special în prezența ionilor trivalenți sau polivalenți (Campbell, 1977).

Mecanismul adsorbției bacteriilor pe suprafața argilelor coloidale nu este cunoscut. Faptul că acestea sînt acoperite de hidroxizi metalici și de sescvioxizi și au o sarcină electronegativă ca și suprafața celulelor bacteriene sugerează intervenția unor mecanisme particulare. După Lynch (1979) este probabil că legarea ar fi realizată prin intermediul unor ioni metalici electropozitivi, care ar acționa ca o punte de legătură (fig. 239).

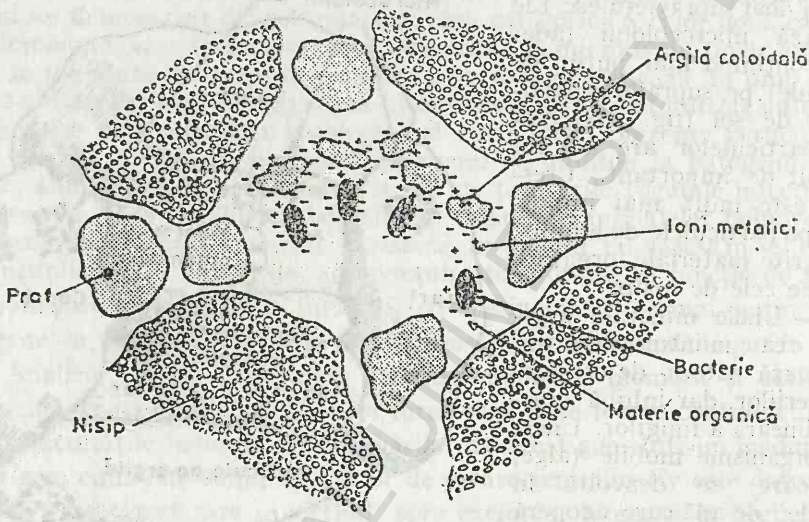



Fig. 239. — Reprezentarea schematică a interacțiunilor dintre bacterii și argilele coloidale (după Lynch, 1979).

Fungii sînt, de asemenea, adsorbiți pe diferite particule în zone de concentrare a unor substanțe organice, pe suprafața cărora se dezvoltă pînă cînd epuizează substratul respectiv. După aceea, ei cresc activ în continuare, în diferite direcții, după hrană, în timp ce hifa originară moare sau chiar este lizată. Din această cauză, uneori, în sol pot fi observate frecvent hife crescînd activ dintr-un miceliu care nu are ceva viu în urma lui.

## BACTERIILE

Reprezentînd grupul cel mai numeros și mai activ din sol, comunitățile bacteriene însumează o bună parte din entitățile sistematice și fiziologice descrise pînă în prezent. În sol predomină bacteriile Gram-negative. Cele Gram-pozitive sînt mai frecvente decît în mediile acvatice și li se adaugă, frecvent, bacterii care au reacții Gram-variabile. Datorită condițiilor specifice fizice, chimice și de nutriție din sol, ca și factorilor de mediu, bacteriile prezintă un pleomorfism accentuat în comparație cu morfologia descrisă drept clasică.

**Aprecierile cantitative** sînt foarte relative. Valorile medii furnizate de tehnicile actuale sînt de $10^6 — 10^8 — 10^9$ celule/g sol uscat, prin tehnica

culturilor (determinarea numărului bacteriilor viabile prin producerea de colonii), și de $10^{10}$ celule, prin tehnicile de numărare directă, care însumează bacteriile vii, dar și pe cele moarte.

Factorii de eroare sînt numeroși (vezi cap. „Cuantificarea"):

— Bacteriile sînt numai rar libere în faza lichidă a solului. Ele se găsesc frecvent sub formă de microcolonii pe diferite resturi vegetale sau adsorbite pe argile și pe humus, inclavate în mase de mucus extracelular etc. În funcție de gradul de dispersie, o microcolonie sau un agregat de bacterii din sol poate forma pe mediile de cultură o singură colonie sau un număr de colonii cît mai apropiat de numărul celulelor individuale din sol.

În general, tehnicile de apreciere a numărului de bacterii din sol prin cultivare în laborator reflectă numai 1—10% din situația reală, deoarece nici un mediu de cultură nu poate satisface enorma diversitate a exigențelor lor nutriționale.

— Acestor condiții majore li se adaugă variații locale, posibile pe suprafețe foarte mici, determinate de umiditate, de pH, de concentrația $O_2$ și a substanțelor organice.

Cunoscînd numărul aproximativ al bacteriilor din sol se poate calcula biomasa lor, fie în funcție de volumul mediu ocupat, fie ca greutate la hectar.

Alexander (1971) propune, ca bază de calcul, un volum aproximativ de 1 $\mu m^3$ per celulă bacteriană și o greutate umedă de $1,5 \times 10^{-12}$ g. Pe aceste criterii, celulele bacteriene ocupă în cazul a $10^8$ celule/g sol uscat 0,01% din volumul total al solului, iar în cazul a $10^9$ bacterii, 0,1%. Pe bază de greutate, în cazul a $10^8$ celule, bacteriile reprezintă 0,015%, iar în cazul a $10^9$ celule, 0,15 din masa totală a solului.

Valorile biomasei propuse de diferiți cercetători oscilează între 0,5 și 6 tone la hectar (calculat pentru un strat de sol gros de 20—25 cm) și, în cazuri extreme, chiar pînă la 10/tone ha în solurile cultivate cu leguminoase. Valorile medii, probabil mai apropiate de realitate, sînt de aproximativ 2,5 tone biomasă/ha.

Pe baza acestor date, bacteriile sînt microorganismele cele mai numeroase din sol, dar sînt depășite uneori ca biomasă de fungi (Satchell, 1970; Berkeley 1971; Gray și Williams, 1971).

Un factor cu importanță fundamentală pentru activitatea bacteriilor în sol este raportul mare suprafață/volum al celulelor lor. Luînd în calcul o suprafață activă de $10^{-8}$ $cm^2$ per celulă, rezultă că bacteriile prezente într-un hectar de sol au o suprafață de cel puțin 250 ha (Drăgan-Bularda și Kiss, 1986).

**Taxonomie.** Marea diversitate a bacteriilor din sol face practic imposibilă stabilirea unei evidențe a speciilor prezente. Cele mai multe sînt probabil neidentificate, iar abaterile de la morfologia normală și de la calitățile tinctoriale fac foarte dificilă această activitate. Pentru a ilustra aceste dificultăți este notoriu cazul unei bacterii care tînără apare sub forma unor bacili Gram-negativi, apoi devine cocoidă și, final, cînd îmbătrînește, Gram-pozitivă.

Solul reunește, în primul rînd, toate bacteriile implicate în circulația carbonului, a azotului, a fosforului, a sulfului, a fierului și a celorlalte elemente în natură, a celor implicate în formarea și degradarea humusului, în solubilizarea compușilor organici și anorganici, insolubili și inaccesibili plantelor etc.

Se adaugă o serie de bacterii heterotrofe mai constant întîlnite, indiferent de particularitățile solului, între care cele aparținînd genurilor: *Acinetobacter, Achromobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Cellulomonas, Chromobacterium, Clostridium, Corynebacterium, Flavobacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Pseudomonas, Sarcina, Staphylococcus, Streptococcus, Xanthomonas* ș.a.

Datele privind frecvența lor relativă sînt nesemnificative și nu au valoare decît raportat la anumite condiții dintr-un sol dat. Astfel, după Alexander (1971, 1977), grupurile *Bacillus, Pseudomonas, Arthrobacter, Agrobacterium* formează peste 90% din colonii. *Arthrobacter* reprezintă între 5 și 35%, iar *Bacillus (B. megaterium, B. cereus* și *B. subtilis)*, aproximativ $10^6$ celule/g sol în regiunile reci și $10^7$ în cele calde.

Atlas și Bartha (1987) consideră drept cele mai frecvente bacteriile *Bacillus* (7—67%), *Arthrobacter* (5—60%) și *Agrobacterium* (1—20%).

Bacteriile sporulate ar reprezenta 25% din total, iar cele anaerobe 5%.

**Factorii care afectează prezența și activitatea bacteriilor din sol.** Studiul proprietăților microhabitatelor în care trăiesc bacteriile a demonstrat că activitatea acestora predomină pe sau în imediata apropiere a suprafeței particulelor de sol. Ea este influențată de o serie de factori de mediu.

*Oxigenul.* Datorită marii heterogenități a solului, adesea într-un volum foarte limitat se pot găsi condiții diferite de tensiune de $O_2$. Frecvent, într-un volum mic de sol, respectiv la distanțe mici, pot fi găsite bacterii aerobe, microaerofile și facultativ sau obligat anaerobe. Cele din genul *Clostridium* sînt prezente frecvent în regiunile fertile, nu datorită anaerobiozei mediului, ci prezenței concomitente a microorganismelor strict și facultativ aerobe, care consumă mult oxigen și îl înlocuiesc cu $CO_2$.

*Temperatura.* Ca regulă generală, bacteriile din sol sînt mai numeroase în regiunile calde decît în cele reci. Speciile individuale pot fi criofile, mezofile sau termofile, acoperind astfel un spectru larg de regiuni de la cele polare pînă la cele tropicale.

*pH.* Condițiile optime pentru dezvoltarea bacteriilor sînt cele situate apropiat de neutralitate, în timp ce la condiții extreme de aciditate sau alcalinitate, numărul este redus prin persistența numai a celor tolerante.

*Adîncimea* este un factor ecologic secundar. Numărul bacteriilor este mai redus la suprafața solului datorită efectului bactericid al radiațiilor solare, modificărilor de temperatură și de umiditate. Este, în general, maxim în primii 5 cm de sub suprafață, după care scade progresiv cu adîncimea. În unele soluri forestiere, numărul maxim al bacteriilor este întîlnit în stratul superior de 1—2 cm. Uneori, în soluri cu conținut bogat organic pot fi găsite în număr mare și în profunzime (în situații excepționale chiar mai numeroase la 150 cm decît la suprafață).

*Umiditatea.* Nivelul optim pentru activitatea bacteriilor aerobe este estimat la o capacitate de reținere a apei de 50—75% (în medie de 60%). Oscilațiile umidității determină variații numerice ale comunităților bacteriene. Excesul de umiditate limitează proliferarea prin diminuarea schimbului de gaze și instalarea condițiilor de anaerobioză.

*Uscăciunea* stimulează sporularea.

*Tipul de sol.* Numărul cel mai mare de bacterii este întîlnit în solul de tip cernoziom, urmat de podzol, solul cenușiu și turbă. Atlas și Bartha (1987) citează lucrările lui Mishustin (1975), care a găsit următoarele valori: cerno-

ziom 3,6 × $10^6$/g sol; cernoziom castaniu 3,5 × $10^6$/g sol; podzol 1,1 — 2,1 × × $10^6$/g sol.

*Natura vegetației.* Numărul bacteriilor este mai mare în solurile de pajiște și de pădure decît în același tip de sol arabil. Explicația rezidă în marea densitate a rădăciniilor, a exsudatelor radiculare, a celulelor radiculare descuamate și a materiei organice rezultate după moartea acestora.

Numărul bacteriilor este mai mare în solul arabil decît în cel virgin și în cel al pădurilor de foioase comparativ cu cel de rășinoase.

**Rolul bacteriilor din sol** este imens. Ele participă în procesele de mineralizare, esențiale pentru nutriția plantelor și asigurarea fertilității solului. Sînt singurele organisme capabile să îmbogățească solul în azot prin fixarea N molecular, din marele rezervor atmosferic. Prin polizaharidele extracelulare participă la agregarea particulelor de sol și la formarea humusului.

Unele bacterii ca *Myxobacteria (Myxococcus, Archangium, Chondrococcus, Polyangium)* sînt bacteriotrofe. Ele au proprietatea de a produce enzime extracelulare și de a liza bacteriile, fungii și algele înainte de a face hidroliza constituenților lor. În felul acesta, pot avea un rol de reglare a numărului microorganismelor din sol, ca și unele bacterii prădătoare *(Bdellovibrio* sp.).

### Actinomicetele

Grup mare de bacterii, tranzitoriu sau constant filamentoase, formînd adesea o rețea micelială ramificată, actinomicetele au fost considerate, inițial, în mod eronat, ca fungi, datorită asemănării lor morfologice (capacitatea de a forma hife ramificate), precum și prezenței sporilor de diseminare (conidiospori, chlamidospori, aplanospori etc.) (Kalakaoustii, 1976). Datorită sintezei unor compuși aromatici conferă mirosul caracteristic solului proaspăt arat.

Sînt considerate la fel de numeroase ca bacteriile „adevărate" ($10^5$—$10^8$/g sol), deși determinările cantitative nu reflectă numărul real și, mai ales, activitatea lor în sol. Sînt mai abundente în solurile pajiștilor și pășunilor decît în solul cultivat, și în solul cultivat decît în cel virgin. Pot reprezenta între 10 și 33% din micropopulația solului.

Coloniile formate pe medii de cultură pot fi originate, deopotrivă, de spori, fragmente de hife sau hife întregi. Unele observații directe pledează pentru prezența lor în sol, în special, sub formă de spori.

Sînt mai abundente în zonele calde decît în cele reci, cele mai multe fiind mezofile, dar includ și specii facultativ sau chiar obligat termofile, care se dezvoltă la 55°—60°C.

Sînt mai numeroase în straturile de la suprafața solului, dar și în orizonturile inferioare, uneori la adîncimi mari (în orizontul C au fost găsite $10^3$—$10^5$ g sol). În general însă, numărul lor scade progresiv cu adîncimea.

În climatul temperat ating densitatea maximă primăvara (datorită în special creșterilor temperaturii) și toamna (datorită aportului masiv de materie organică). Numărul minim este înregistrat iarna.

Nu tolerează solurile acide și nu se dezvoltă sub pH 5,0. De aceea, acidifierea solului poate fi folosită pentru combaterea speciilor patogene. Sînt mai numeroase în solurile alcaline. Johnstone (1948) citează un caz excepțional, într-un sol alcalin din atolul Bikini din Pacific, în care actinomicetele reprezintă 95% din populația bacteriană.

Umiditatea excesivă reprezintă un factor care le limitează dezvoltarea.

Actinomicetele preferă solurile bogate în substanțe organice. După adăugarea acestora în sol, inițial, apar bacteriile și fungii, care se dezvoltă mai rapid și au o mai mare versatilitate biochimică. Actinomicetele, care se dezvoltă mai lent și au numai o slabă capacitate de competiție, încep să se dezvolte cînd nutrienții tind să devină limitanți și presiunea competitorilor cei mai activi scade. Ele se dezvoltă heterotrof, folosind surse de C simple sau complexe (glucide simple, acizi organici, dar și polizaharide, hidrocarburi alifatice), atacînd lent molecule mai rezistente, cum sînt celuloza *(Nocardia cellulans, N. vaccinii, Streptomyces violaceus, S. cellulosae)*, chitina, parafinele *(N. paraffinae)*, fenoli *(N. opaca, N. rubra)* etc.

Produsul-cheie în asimilarea N îl constituie $NH_3$ și nitratul, dar folosesc și aminoacizii și peptonele.

Speciile cel mai frecvent întîlnite aparțin genurilor: *Actinomyces, Actinoplanes, Mycobacterium, Mycococcus, Micromonospora, Nocardia, Streptomyces, Streptosporangium, Thermoactinomyces.*

**Semnificația biologică** globală a actinomicetelor în sol este greu de apreciat. Numărul mare de spori prezenți în sol contrastînd net cu numărul redus al hifelor active au făcut pe mulți specialiști să le acorde o importanță mai mică decît cea a bacteriilor și a fungilor.

Între activitățile demonstrate fără echivoc sînt de menționat:

1) Rolul actinomicetelor în mineralizarea unor compuși mai rezistenți (chitina) la acțiunea bacteriilor și fungilor, corelat cu apariția lor tardivă în succesiunea microorganismelor care produc descompunerea materiei organice în sol.

2) Contribuția la formarea humusului prin producerea de compuși aromatici și la asigurarea structurii solului prin agregarea particulelor de sol.

3) Capacitatea de a fixa azotul molecular, caracteristică genului *Frankia*, și de a forma simbioze de tipul actinorizelor (vezi cap. *Simbioza)*.

4) Producerea unei game largi de substanțe antibiotice (streptomicină, tetracicline, cloramfenicol, kanamicină, micostatină etc.), care pot regla densitatea bacteriilor sau a fungilor în anumite microhabitate sau pot îndepărta unii patogeni.

5) Unele actinomicete sînt fitopatogene ca, de exemplu, *S. scabiei*, care produce rîia comună a cartofului.

6) Actinomicetele termofile pot fi dominante în paiele încinse, în grămezile de compost și în unele gunoaie de grajd.

### Cianobacteriile

Cianobacteriile sînt bacterii fototrofe care formează cruste pe suprafața solurilor umede, lipsite de vegetație, sau se dezvoltă în stratul superior iluminat al solului. Preferă mediile neutre sau alcaline. Nu se dezvoltă în soluri cu pH mai mic de 5,2. Rezistă la o gamă largă de temperaturi.

Genurile cele mai frecvent întîlnite sînt: *Anabaena, Aulosira, Calothrix, Chroococcus, Cylindrospermum, Lyngbya, Microcoleus, Nodularia, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Plectonema, Schizothrix, Scytonema, Tolypothrix.*

Se pot dezvolta și la întuneric, chemoorganotrof, efectuînd transformări ale unor compuși organici simpli, esențiali pentru menținerea fertilității solului.

Datorită activității lor fotosintetizante și capacității de a utiliza compuși anorganici simpli, cianobacteriile se pot dezvolta pe suprafața solurilor aride, acționînd ca microorganisme-pionier.

Un rol important revine speciilor fixatoare de azot molecular (*Anabaena, Calothrix, Chroococcus, Nostoc, Plectonema, Schizothrix* și altele). Cianobacteriile contribuie la legarea particulelor de sol și la stabilizarea structurii acestuia.

## FUNGII

Fungii reprezintă o parte importantă din biomasa microbiană din anumite tipuri de sol. Deși mai puțin numeroși în comparație cu bacteriile datorită creșterii hifale depășesc, adesea, greutatea globală a acestora.

**Abundența fungilor în sol.** Aspectele cantitative ale prezenței fungilor în sol, deși mult studiate, nu dau informații exacte în ceea ce privește numărul și mai ales activitatea lor. Concluzia generală este că, deși fiecare din numeroasele tehnici folosite are anumite avantaje, rezultatele lor sînt denaturate de o serie de condiții specifice al căror efect poate fi minimalizat prin utilizarea concomitentă a mai multor tehnici. Dezvoltarea tehnicilor de examinare directă sînt falsificate de faptul că hifele moarte persistă în sol peste 6 luni și frecvent numărul lor este foarte mare. În plus, cele vii pot fi metabolic active și se dezvoltă pe medii artificiale, metabolic active care nu cresc, metabolic inactive, dar capabile să se dezvolte în culturi și metabolic inactive, care nu se dezvoltă decît după ce sînt expuse unor artificii de tehnică.

Cultivarea pe medii selective (pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor) favorizează speciile care cresc repede, pe cele care sporulează abundent și pe cele care pot folosi eficient nutrienții din mediul de cultură (Jackson, 1975). Agitarea probei determină dezintegrarea hifelor într-un număr imens de fragmente și dispersarea sporoforilor cu eliberarea sporilor individuali, fiecare generînd o colonie pe mediile artificiale.

Întrucît practica demonstrează că majoritatea coloniilor sînt generate de spori, datele obținute pe această cale reflectă în special activitatea fungilor într-o perioadă anterioară examenului de laborator. De aceea, mulți cercetători recomandă ca mai utilă, aprecierea cantitativă a biomasei, deși se consideră că tehnicile actuale de măsurare directă a hifelor evidențiază numai o cincime din lungimea lor reală. Alexander (1971) recomandă pentru orientare o greutate de 5 μg și o greutate specifică de 1,2 pentru 10 m de hife viabile.

Cu aceste rezerve, se apreciază că numărul unităților fungice per gram de sol variază între 20 000 și 1 000 000 (înțelegînd prin unitate fungică un spor, o hifă sau un fragment de hifă, capabile să genereze o colonie).

Dowding și Widden (1974) apreciază că, în funcție de natura solului și a vegetației, lungimea medie a hifelor poate să ajungă la cîteva mii de metri per gram de sol (respectiv 7 000 m per gram de sol uscat într-o pădure de mesteacăn).

Greutatea biomasei fungice într-un sol în care lungimea hifelor este de 1 602 m/g sol poate atinge 7,66 g/m$^2$.

**Levurile** din sol sînt considerate ca autohtone, deși pot fi și specii alohtone provenite din diferitele resturi vegetale căzute pe sol. Sînt, în general, mai puțin studiate. În regiunile temperate ajung la $10^3$ celule/g sol (limitele sînt cuprinse între 200 și 20 000 celule/g sol).

Speciile cele mai frecvent întîlnite aparțin genurilor: *Candida, Cryptococcus, Debaromyces, Hansenula, Kluyveromyces, Lipomyces, Pichia, Pullularia, Rhodotorula, Saccharomyces, Schizoblastosporium, Torula, Torulopsis, Trichospora, Zygosaccharomyces* ș.a.

### Mucegaiurile

**Taxonomie.** După Burges (1966), fungii din sol aparțin la peste 600 de specii, între care 200 *Phycomycetes*, 32 *Ascomycetes* și 385 *Fungi imperfecti* *. Opiniile sînt împărțite în ceea ce privește fungii din clasa *Basidiomycetes* al căror număr ca specii este considerat ca minim de către unii cercetători, în timp ce alții îl estimează ca fiind de ordinul zecilor sau chiar sutelor.

Cele mai importante sînt următoarele:

Clasa *Phycomycetes* este reprezentată de fungi aparținînd la două ordine: ord. *Mucorales*, cu genurile *Absidia, Cunninghamella, Mortierella, Mucor, Rhizopus* și *Zyorhynchus* etc., și ord. *Peronosporales*, în special cu genul *Pythium* (Alexander, 1971). Fungii din clasa *Phycomycetes* nu sînt foarte numeroși în sol, dar unii reprezentanți sînt larg răspîndiți în solurile cultivate. Unele specii sînt fitopatogene.

Clasa *Ascomycetes* este reprezentată, în special, de genurile *Chaetomium* și *Morchella*. Deși puțin diverse, sînt prezente invariabil și au un rol important în circulația biologică a elementelor din sol. Folosesc diferiți compuși organici, inclusiv dintre cei cu structură complexă (celuloză, hemiceluloze, pectină etc.). Sînt numeroase în solurile bogate în substanțe organice. Tolerează limite largi de pH, putînd fi găsite și în solurile foarte acide (pH 3,0), probabil datorită lipsei de competitori.

Clasa *Fungi imperfecti*, probabil cea mai numeroasă, este reprezentată, după Alexander (1971), precum și după Atlas și Bartha (1987), de genurile: *Alternaria, Aspergillus, Arthrobotrys, Aureobasidium, Botrytis, Cephalosporium, Cladosporium, Curvularia, Cylindrocarpon, Fusarium, Geotrichum, Gliocladium, Helminthosporium, Myrothecium, Penicillium, Phoma, Trichoderma, Trichothecium, Turbecularia, Verticillium* ș.a.

Clasa *Basidiomycetes*, cu genurile *Agaricus, Amanita, Boletus, Coprinus, Rhizoctonia, Russula* ș.a. Deși izolate rar din unele soluri, sînt importante în degradarea substanțelor organice. Formează asociații de tipul micorizelor cu rădăcinile arborilor.

**Ecologie.** Fungii din sol sînt microorganisme indigene sau alohtone care trăiesc liber sau în asociație cu rădăcinile plantelor.

Sînt răspîndiți, în special, în primii 10 cm de la suprafața solului, în litiera cu substanțe organice în curs de descompunere, în solurile cultivate, în cele forestiere, ca și în cele cu pH acid. Numărul lor scade cu adîncimea pentru a fi rari la 30 cm și prezenți în număr mic chiar la 100 cm.

Adăugarea de îngrășăminte organice ca, de exemplu, gunoiul de grajd stimulează mult multiplicarea fungilor, care ajunge cote maxime la cîteva luni de la adăugarea materiei organice adiționale.

Speciile prezente în profilul unui sol sînt diferite în raport cu adîncimea, fapt care depinde nu numai de concentrația și natura compușilor

* Datorită punctelor de vedere diferite din domeniul Micologiei s-au păstrat poziția sistematică și nomenclatura fungilor utilizate de autorii citați în text.

organici, ci și de diferențele între concentrația $O_2$ și $CO_2$. Unii fungi sînt neinhibați de prezența unor concentrații mari de $CO_2$ și, ca urmare, sînt prezenți fie pe întreg profilul unui sol, fie numai în adîncime. Cei sensibili sînt prezenți numai în straturile superioare sau la suprafața litierei, fiind rari sub adîncimea de 5 cm. Aerobioza strictă (deși există și unele excepții) explică preponderența lor în straturile de suprafață ale solului și absența în bălți și mlaștini, în solurile inundate, în straturile adînci ale turbăriilor nedrenate. În aceste medii pot persista sub formă de spori care germinează și reiau creșterea după drenarea solurilor respective.

Sînt, de aceea, în număr mic în solurile cu exces de umiditate datorită în special deficitului de $O_2$, prin îngreuiarea difuziei, dar persistă sub formă de spori la uscăciune, chiar în solurile semiaride.

**Temperatura.** Fungii din sol sînt, în general, mezofili. Speciile termofile care se dezvoltă la 50°C au fost descrise în gunoiul de grajd.

Dezvoltarea lor necesită anumite condiții de umiditate fapt demonstrat și experimental: pe măsură ce umiditatea solului crește spre valorile optime, numărul unităților hifale crește progresiv, iar cel al sporilor regresează. Alexander (1971) citează lucrările lui Eggleton (1934) care a arătat că la o umiditate de 8,9% solul de pajiște conține 60 de unități hifale și 39 de spori (39% din totalul evidențiat). La o umiditate de 27%, numărul hifelor evidențiate este de 153, iar al sporilor de 20 (12% din total).

**pH.** Ca grup, fungii sînt foarte toleranți la valori extreme de pH, respectiv între 2,0 și 9,0. Speciile individuale sînt mai puțin tolerante, cele patogene, spre exemplu, dezvoltîndu-se numai în limite restrînse. Prezența fungilor în solurile foarte acide s-ar datora în mai mică măsură toleranței la valori mici de pH și, mai ales, lipsei de competitori, deoarece bacteriile (inclusiv actinomicetele) nu se pot dezvolta în condițiile respective.

**Natura vegetației** ar avea un efect selectiv, fapt demonstrat prin numărul mare de *Aspergillus fumigatus* în solul din apropierea rădăcinilor stejarilor și de *Penicillium funiculosum* în cel de porumb. Fenomenul ar reprezenta fie un răspuns la secreții radiculare specifice, fie la constituenți chimici rezultați din descompunerea țesuturilor supuse degradării.

**Activitatea fungilor din sol.** Fungii din sol au un comportament oportunist.

— Cînd condițiile sînt favorabile (concentrație mare de nutrienți, condiții adecvate de oxigenare și umiditate) se dezvoltă masiv, degradînd o gamă largă de substanțe organice, de la cele mai simple (hexoze, pentoze, acizi organici, aminoacizi, peptide) la polimeri cum sînt proteinele, celuloza și chiar lignina. În aceste condiții se comportă ca microorganisme zimogene, determinînd mineralizarea substanțelor organice din litiera bine aerată, în care, datorită biomasei superioare, pot depăși activitatea bacteriilor. Prin aceasta, au un rol esențial în circulația biologică a elementelor în natură.

— În absența nutrienților utili sau a altor condiții adecvate trec în stare de latență, pînă cînd condițiile redevin favorabile pentru creștere. Chiar miceliile pot deveni inactive în sol.

— Participă la formarea structurii solului prin efectul de imobilizare mecanică și agregare a particulelor de sol, asigurînd stabilitatea acestora.

— Au rol în formarea humusului, deoarece multe specii (*Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Dematium, Gliocladium, Helminthosporium, Humicola, Metarrhizium* etc.) produc substanțe aromatice asemănătoare lignineloor,

care sînt introduse în rezerva din sol, ce va forma, prin sinteze și conversii chimice, materialele humice.

— Unii fungi acționează ca prădători, putînd participa la menținerea echilibrului biologic în sol. Unele specii atacă protozoarele, cărora le digeră conținutul citoplasmatic, diminuîndu-le numărul și influențînd indirect dezvoltarea bacteriilor. Altele capturează nematodele (vezi cap. *Prădarea*).

— În sfîrșit, unii fungi din sol produc substanțe antibiotice, iar alții formează asociații micorizice cu rădăcinile plantelor (vezi cap. *Simbioza*).

## ALGELE

Algele sînt abundente în habitatele umede și iluminate de la suprafața solului și în stratul superior de cîțiva mm pînă la cîțiva centimetri. După aceea, numărul scade considerabil cu adîncimea. Celulele algale întîlnite la adîncimi mai mari (uneori la 50—100 cm) sînt transportate accidental în regiunile respective sub influența a diferite forțe mecanice (scurgerea apei, acțiunea rîmelor sau a animalelor mici etc.). Oricum, în regiunile respective nu se multiplică, sînt în stare de latență și fiind alohtone sînt, probabil, folosite ca hrană de alte organisme.

Numărul lor este variabil în funcție de condițiile de mediu și poate oscila între cîteva sute și 50 000. Pot ajunge la densități mari, de ordinul milioanelor, cînd se dezvoltă pe suprafața solului umed, producînd „înfloriri" ale acestuia, vizibile cu ochiul liber.

Ca și în cazul altor microorganisme, tehnicile de estimare a densității și a activității lor în sol nu dau rezultate foarte sigure. Există și unele dificultăți specifice, în sensul că speciile filamentoase determină formarea unui număr mic de colonii, deși biomasa lor, ca și activitatea sînt importante, iar formele coloniale, greu de dispersat, produc o colonie unică.

**Taxonomie.** Algele din sol aparțin încrengăturilor *Chlorophyta, Bacillariophyta (Diatomeae)* și *Xanthophyta*, și sînt reprezentate de tulpini cu dimensiuni mai mici și structură internă mai simplă decît exemplarele acvatice (Alexander, 1971). Cele mai frecvent întîlnite sînt următoarele:

*Chlorophyceae* (alge verzi). Mai frecvente în solurile acide și mai rare în cele alcaline, sînt reprezentate de genurile: *Ankistrodesmus, Chlamydomonas, Chlorella, Chlorococcum, Cladophora, Coccomyxa, Dactylococcus, Dictysphaerium, Hermidium, Mesotenium, Pleurococcus, Protococcus, Scenedesmus, Ulothrix*. Unele specii *(Chlorococcus humicola)* sînt specifice pentru sol.

*Diatomeae*. Prezente în solul cu pH neutru sau ușor alcalin, sînt unicelulare sau coloniale, cu partea externă silicifiată. Genurile cele mai frecvent întîlnite sînt: *Achnantes, Cymbella, Fragillaria, Hantzschia, Navicula, Nitzschia, Pinnularia, Surirella, Synedra* etc.

*Xanthophyceae*. Algele galben-verzi, cele mai rare, sînt reprezentate de genurile: *Botrydiopsis, Botrydium, Bumilleria, Bumilleriopsis, Heterococcus, Heterothrix, Vaucheria* etc. (Alexander, 1971).

**Ecologie.** Algele de la suprafața solului cu nutriție fotolitotrofă se dezvoltă în condiții de umiditate și iluminare adecvată. Ele folosesc nutrienți minerali ($CO_2$, N, P, K, MgS, Fe și alții) pentru a face sinteze organice.

Umiditatea necesară este de 60%, fapt care explică dezvoltarea lor după ploaie și în solurile irigate. Cînd solul este uscat, numărul lor scade brusc, cele mai sensibile la uscăciune fiind diatomeele.

Ca grup, se dezvoltă în limite largi de pH (3,7—8,2), dar speciile individuale au preferințe variabile. În general, algele verzi predomină în mediile acide, probabil în lipsa competitorilor.

Preferințele termice sînt variabile în funcție de specie. Pot trăi atît la temperaturi scăzute, cît și la temperaturi medii și mai ridicate (au fost evidențiate și în Sahara). În regiunile temperate, numărul maxim este atins primăvara și toamna.

Cele din straturile mai profunde ale solului se pot dezvolta slab chemoorganotrof, utilizînd ca sursă de carbon diferite glucide (glucoză, zaharoză, galactoză, amidon) sau unii acizi organici (acidul citric). Readuse la suprafață reiau creșterea fotosintetică.

**Semnificația biologică în sol.** Relativ puțin studiată și cuantificată activitatea microalgelor este considerată ca fiind relativ puțin semnificativă pentru transformările biochimice din sol, în comparație cu alte microorganisme.

Dezvoltarea intensă a algelor pe suprafața solului umed îl îmbogățește în constituenți organici (biomasă algală) rezultați prin fotosinteză.

Algele verzi sînt, alături de cianobacterii, primii colonizatori ai solurilor denudate, necultivate sau lipsite de forme de viață (ca, de exemplu, după erupțiile vulcanice).

Acționează ca organisme-pionier, îmbogățind progresiv solurile respective în substanțe organice (în special după moartea lor), făcîndu-le treptat accesibile altor microorganisme și, final, plantelor verzi.

Afectează favorabil structura fizică a solului, favorizînd agregarea și menținerea particulelor de sol și împiedică eroziunea acestuia.

În schimb, în cazurile în care colonizează rocile și obiecte de artă de piatră favorizează eroziunea și degradarea acestora.

În solurile acoperite de apă, cum sînt cele din orezării, datorită fotosintezei, îmbogățesc mediul în oxigen cu efecte benefice asupra rădăcinilor submerse.

## PROTOZOARELE

Protozoarele din microbiota permanentă, mai puțin diferite decît cele din mediul acvatic, sînt prezente mai ales la suprafața solului umed și în cei 15 cm superiori. Sînt rare în straturile adînci, probabil, în special, datorită exigențelor mari de $O_2$.

În sol predomină forme foarte mici comparativ cu echivalenții lor din apele dulci și marine (spre exemplu, unele ciliate din sol au 10—80 μm, în timp ce ciliatele acvatice pot atinge 2 mm) (Alexander, 1971).

Deși numărul lor variază între 10 000 și 300 000 (cel mai frecvent 10 000—100 000) sînt mai importante ca biomasă decît bacteriile. Acest număr prezintă fluctuații mari de la o zi la alta (de la cîteva sute la sute de mii), corelate invers cu mărimea populațiilor bacteriene. De asemenea, pot prezenta fluctuații numerice diurne, în funcție de temperatură, umiditate, disponibilitatea nutrienților etc.

Ca și în cazul altor microorganisme, determinările cantitative trebuie interpretate cu prudență ca exprimînd valori potențiale nu de activitate efectivă, de data aceasta datorită numărului mare de forme de rezistență.

Chiștii protozoarelor au o toleranță mare la condițiile de mediu (la temperaturi și pH nefavorabile și la uscăciune), precum și o capacitate

rapidă de închistare și de germinare (Darbyshire, 1975). Chiștii rezistă la temperaturi ridicate (70°C) și la HCl 2%, care inactivează formele vegetative.

În unele soluri normale, raportul spori/forme vegetative este de 52%, în timp ce în solul tratat cu gunoi de grajd este de numai 35%.

**Condițiile de mediu** favorabile dezvoltării protozoarelor sînt relativ puțin cunoscute.

Umiditatea este în mod cert o condiție esențială pentru existența formelor active și pentru mobilitatea lor și dispersia în sol, în timp ce uscăciunea favorizează închistarea.

Limitele de pH, variabile după specie, sînt cuprinse între 3,5 și 9,0.

Temperatura optimă este de 19—25°C.

**Nutriție.** Unele protozoare sînt saprozoice (utilizează ca hrană materia vegetală sau animală în formă de compuși organici dizolvați). Foarte multe sînt holozoice (nutriție de tip animal, ingerînd materie organică complexă) și ingeră în special bacterii, alge, dar chiar și alte protozoare.

Nutriția protozoarelor cu bacterii, cel mai mult studiată, are un pronunțat caracter de selectivitate, în sensul că unele bacterii sînt „prădate" ușor, altele rar și altele chiar deloc. Fenomenul, puțin cunoscut, pare să țină de particularitățile protozoarelor de a recunoaște anumite specii-pradă. Ca probă, unele bacterii pot fi ingerate de un protozoar, nu însă și de altul. Selectivitatea poate depăși limitele de specie în așa fel încît unele tulpini sînt sensibile, iar altele nu.

Dintre bacteriile cel mai frecvent ingerate, Alexander (1971) menționează: *Agrobacterium, Bacillus, Enterobacter* sp., *Escherichia, Micrococcus, Pseudomonas.*

În lipsa nutrienților și în condiții de mediu defavorabile, protozoarele formează chiști, forme de latență și de rezistență (persistă mai mulți ani). Germinarea lor este condiționată de prezența nutrienților și de condiții adecvate de mediu. În cazul protozoarelor holozoice, germinarea este condiționată de prezența bacteriilor în mediu și are, de asemenea, caracter selectiv: unele bacterii favorizează germinarea rapidă, altele numai lentă, iar altele rapidă, dar incompletă (fig. 240).

**Taxonomie.** După Alexander (1971), precum și după Darbyshire (1975), cele mai răspîndite protozoare din sol aparțin la trei grupuri majore: *Rhizopoda (Sarcodina), Flagellata (Mastigophora)* și *Ciliata.*

Clasa *Sarcodina,* care include protozoare mobile cu ajutorul pseudopodelor, cuprinde genurile: *Acanthamoeba, Amoeba, Biomyxa, Euglypha, Difflugia, Hartmanella, Mayorella, Nuclearia, Naegleria, Trinema, Leptomyxa.*

Clasa *Mastigophora* cuprinde, pe lîngă subgrupa *Phytomastigophora,* flagelate care conțin clorofilă și cresc fotosintetic, subgrupa *Zoomastigophora.* Aceasta include flagelate heterotrofe ce formează marea majoritate a protozoarelor din sol, aparținînd genurilor: *Allantion, Cercobodo, Bodo, Cercomonas, Entosiphon, Heteromita, Monas, Oikomonas, Spiromonas, Tetramitus.*

Clasa *Ciliata* este reprezentată prin genurile: *Balantidium, Balanthiophorus, Colpidium, Colpodum, Gonostomum, Halteria, Oxytricha, Pleurotricha, Saprophilus, Uroleptus, Urotricha, Vorticella* ș.a. Ele sînt în minoritate, datorită sensibilității mai mari la uscăciune și barierelor fizice reprezentate de sol.

**Semnificația biologică.** Rolul protozoarelor în sol nu este riguros determinat. Numărul mare și biomasa, prezența ubicvitară de la poli la ecuator, ca și multe fapte de observație pledează pentru intervenția lor în unele procese importante pentru viața din sol.

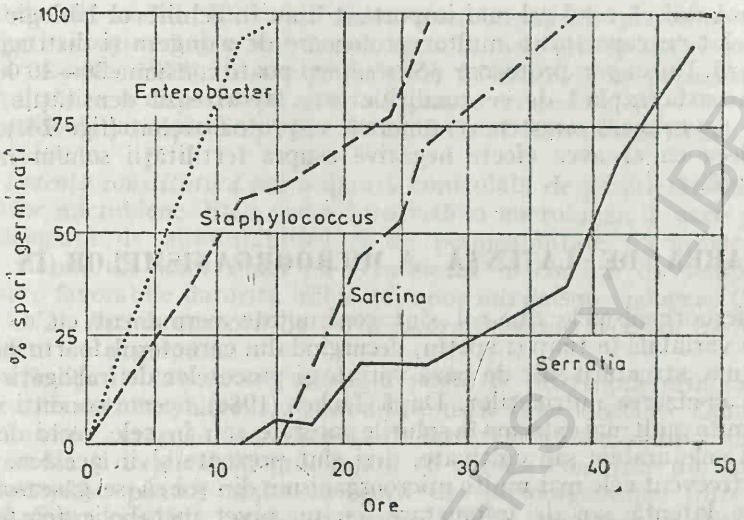



Fig. 240. — Influența selectivă a patru specii de bacterii asupra germinării sporilor de protozoare (după Kunicki-Goldfinger și colab., 1957).

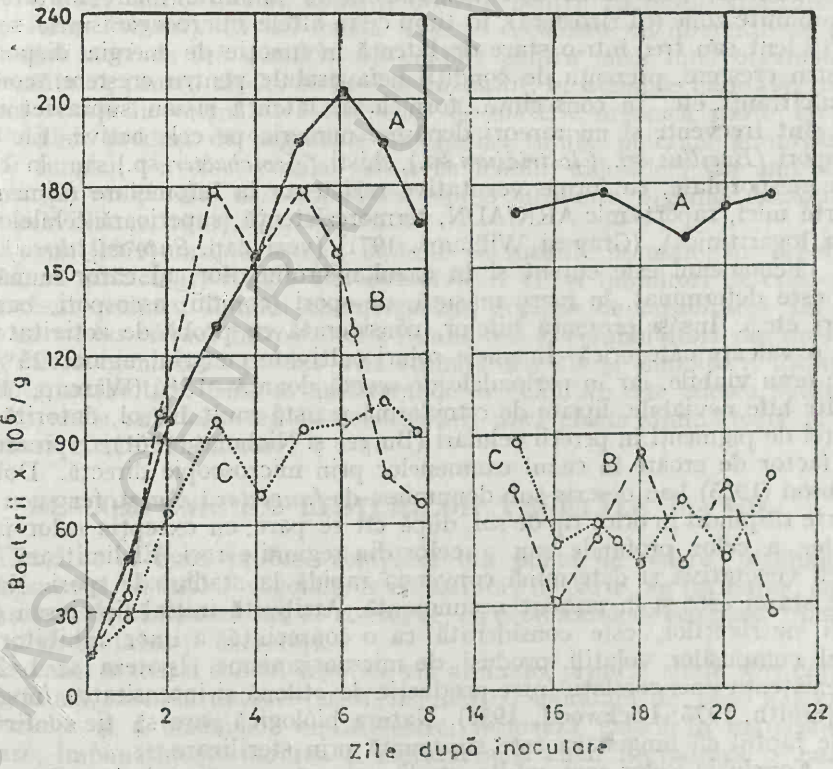



Fig. 241.—Modificările numărului bacteriilor în solul steril inoculat numai cu bacterii (A) sau cu bacterii și amibe *(Dimastigonema gruberi)* (B) și respectiv bacterii și flagelate *(Cercomonas crassicauda)* (C) (după Alexander, 1961).

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Probabil că rolul cel mai important îl au în echilibrul biologic al solului, corelat cu capacitatea multor protozoare de a ingera și distruge o serie de bacterii. Un singur protozoar *(Sarcodina)* poate consuma 30—40 000 bacterii/zi. Aceasta explică de ce condițiile care favorizează densitățile mari de bacterii favorizează creșterea numerică a protozoarelor (fig. 241).

Ideea că ar avea efecte negative asupra fertilității solului nu a fost confirmată.

## STAREA DE LATENȚĂ A MICROORGANISMELOR ÎN SOL

Microorganismele din sol sînt confruntate permanent cu o serie de condiții variabile în timp și spațiu, decurgînd din caracterul foarte heterogen al acestuia, structurii sale de bază variate și proceselor de îmbogățire, alternînd cu epuizarea nutrienților. După Tinker (1986), aceste condiții variabile ating limite mult mai extreme în solurile naturale sau în cele vechi de pășune decît în cele arabile sau cultivate, deși sînt prezente și în acestea. Aceasta face ca frecvent cele mai multe microorganisme din sol să se găsească într-o stare de latență sau de înfometare, cu un nivel metabolic foarte scăzut (Paul, 1984; Tinker, 1986).

Practic, activitatea este concentrată în anumite microhabitate sau în anumite zone (ca rizosfera), în timp ce în altele microorganismele se dezvoltă lent sau trec într-o stare de latență în funcție de energia disponibilă pentru creștere, prezența de condiții nefavorabile pentru creștere, compuși recalcitranți etc. În consecință, formele de latență și/sau supraviețuire în sol sînt frecvente și nu rareori depășesc numeric pe cele active. Ele apar ca spori *(Bacillus* sp., *Clostridium* sp.), chisti *(Azotobacter* sp.) sau, la bacteriile nesporulate, ca forme vegetative rezistente la înfometare (dimensiuni foarte mici, raport mic ARN/ADN, termorezistență, superioară celulelor din faza logaritmică), (Gray și Williams, 1971) (vezi cap. *Supraviețuirea)*.

Fenomenul este curent și în cazul microfungilor, al căror număr în sol este determinat, în mare măsură, de spori (conidii, ascospori, basidiospori etc.). Însăși prezența hifelor, considerată ca probă de activitate, nu are o valoare categorică. În unele soluri cultivate cu grîu, numai 23% din hife erau viabile, iar în perioadele de secetă doar 3—15% (Warcup, 1957). Multe hife neviabile, lipsite de citoplasmă rezistă mult în sol, datorită prezenței de pigmenți în pereții celulari (Burges și Nicholas, 1961), reprezentînd un factor de eroare în cazul examenelor prin microscopie directă. Dobb și Hobson (1953) l-au descris sub denumirea de *fungistază*. Acest fenomen este foarte răspîndit în orice tip de sol, după cît se pare, cu excepția celor foarte acide, a celor profunde sau a celor din regiunile reci. El limitează creșterea vegetativă și determină conversia rapidă la stadiul de spori. Natura fungistazei este și în prezent necunoscută. Atribuită inițial lipsei sau epuizării nutrienților, este considerată ca o consecință a unor inhibitori de tipul compușilor volatili produși de microorganisme. Ipoteza se bazează pe existența unei corelații între producția de etilenă și intensitatea fungistazei (Smith, 1973; Lockwood, 1981). Natura biologică pare să fie confirmată și de faptul că fungistaza este suprimată prin sterilizare.

Concluzia celor mai multe studii este că marea majoritate a microorganismelor din sol ar fi relativ inactivă, uneori pentru perioade îndelungate de timp, în special datorită lipsei de nutrienți disponibili și unor condiții

nefavorabile de mediu. Existența unor microorganisme active mai mult sau mai puțin continuu nu a fost demonstrată în mod univoc (Gray și Williams, 1971; Lynch, 1979). În aceste perioade de inactivitate, capacitatea de supraviețuire are o importanță esențială pentru viața din sol.

**Tipurile de latență.** După Sussman (1965) ar exista două tipuri diferite de latență:

1) *Latența constitutivă* are o durată controlată de proprietăți intrinseci ale celulelor microbiene. Ea a fost evidențiată la microfungi, la care pare să fie condiționată de autoinhibitori și de permeabilitate. Ca urmare, propagulele viabile ale unor fungi nu germinează în condiții de temperatură și umiditate favorabile datorită influenței unor mecanisme endogene (Watson și Ford, 1972). Astfel, oosporii de *Phytophtora cactorum* necesită 3—4 săptămîni înainte de a germina.

În condiții de laborator, toleranța poate fi întreruptă prin expunere la temperaturi extreme, alternanță umiditate/uscăciune, substanțe chimice etc.

2) *Latența „exogenă"* este impusă de factori fizici sau chimici nefavorabili din mediu și explicabilă prin faptul că rareori condițiile din sol ating cote avantajoase pentru multe categorii de microorganisme. Între altele, echilibrul dintre condiția aerobă și anaerobă este foarte delicat. Particulele de sol cu Ø mai mare de 3 mm sînt aerobe la suprafață, dar au un centru anaerob. Solul inundat oferă condiții diferite pentru bacteriile anaerobe și pentru fungi (aerobi). În sol există situsuri localizate cu diferențe de pH uneori mai mari de 0,5 unități, convenabile pentru unele microorganisme, dar dăunătoare pentru altele. În mod asemănător, în anumite habitate, temperatura locală în vecinătatea resturilor de materie organică poate crește cu 5°C. Unii produși de degradare ai ligninei inhibă puternic germinarea sporilor fungici. Un efect similar pot avea fenolii, aldehidele sau unii acizi organici proveniți din descompunerea unor substanțe organice reziduale (Gray și Williams, 1971).

Lynch (1979) insistă asupra faptului că mediile naturale, în general, și solul, în particular, conțin atît stimulatori, cît și inhibitori de creștere, iar succesul evolutiv al unui microorganism depinde de capacitatea lui de a găsi un *modus vivendi* între factorii stimulatori și cei inhibitori din mediu. Înseși microorganismele produc atît stimulatori, cît și inhibitori, inclusiv substanțe antibiotice. Găsirea unei formule de echilibru este adesea subtilă, deoarece unele substanțe au în concentrații mici efecte stimulatoare și în doze mari efecte inhibitoare.

## DESCOMPUNEREA RESTURILOR VEGETALE ÎN SOL

Rezultat al unor procese complexe din punct de vedere biochimic, descompunerea resturilor vegetale este asociată, în parte, cu formarea unor compuși noi, de biosinteză sau de conversie, cu producerea de biomasă microbiană și de metaboliți excretați.

În cazul materiei solide, vegetale sau animale, primele stadii sînt dominate de faună, care mărunțește țesuturile, mărind suprafața de atac a microorganismelor și a enzimelor extracelulare, formează galerii în materialele lemnoase, îmbunătățește aerarea și hidratarea și chiar degradează o parte din materia ingerată. În plus, acționează ca vectori, dispersînd microorganismele active în procesele degradative fie legate de suprafața corpului, fie prin eliminarea conținutului intestinal.

Compuşii hidrosolubili şi, în special, glucidele dispar primele, în timp ce proteinele uşor hidrolizabile sînt degradate în cîteva zile sau săptămîni (Burges, 1966). Celuloza, hemicelulozele şi ligninele sînt atacate lent în stadiile tardive.

Se ştie foarte puţin despre degradarea cutinei şi a suberinei, care formează o fracţiune semnificativă cantitativ din materiile adăugate. Se pare că sînt degradate foarte lent, fapt atestat de prezenţa lor şi după degradarea celulozei şi parţial a ligninei. De asemenea, există numai puţine informaţii privind degradarea în sol a unor produşi secundari ai plantelor, cum sînt taninurile, antocianinele, flavonele etc.

Procesele de descompunere a resturilor vegetale în sol evoluează lent, atît datorită arhitecturii chimice complexe a unora din constituenţii lor, cît şi deficitului de N, care acţionează, adesea, ca un factor limitant pentru creşterea şi multiplicarea microorganismelor. De aceea, se consideră că raportul C/N al unui substrat reprezintă un indicator util al vitezei cu care poate fi degradat.

**Moleculele recalcitrante.** Solul conţine o gamă largă de molecule naturale caracterizate printr-o mare rezistenţă la degradare. Ele includ, pe lîngă materialele humice (acizii humici şi fulvici), lignine, cutină, melanine, taninuri etc., cărora li se adaugă, în ultimele decenii, substanţele de sinteză (pesticidele organoclorurate, fenolii bioclorurați) şi polimerii sintetici (acetatul de celuloză, alcoolul polivinilic, polietilena etc.). Pentru majoritatea moleculelor recalcitrante au fost descrise microorganisme capabile să le degradeze mai mult sau mai puţin lent (tabelul nr. 45). Substanţele de sinteză se încadrează în diferite grade de recalcitranţă faţă de atacul microorganismelor, putînd merge *in extremis* la rezistenţă totală (acetat de celuloză, polietilenă).

Burns (1983) citează între principalele proprietăţi care conferă rezistenţă mare la degradarea de către microorganisme:

1) greutatea moleculară excesivă;

2) absenţa din echipamentul enzimatic a enzimelor capabile să le degradeze;

3) natura şi poziţia intramoleculară a substituenţilor;

4) existenţa în structură a unor cicluri aromatice înalt condensate;

5) marea complexitate a unor heteropolimeri, care necesită intervenţia concertată a mai multor specii de microorganisme (şi de enzime) înainte de a deveni accesibili degradării eficiente;

6) efectul inhibitor pentru microorganisme al unor molecule organice (solvenţi, compuşi fenolici etc.).

Datorită acestor particularităţi, unele molecule organice au o viaţă îndelungată, persistînd în mediu ani, decenii, secole sau chiar milenii. Astfel, timpul de înjumătăţire a unor substanţe poliaromatice cu greutate moleculară de $2 \times 10^6$ dal, măsurat prin datare cu radiocarbon, este apreciat la cîteva mii de ani. La limita extremă se situează structurile microbiene de tipul endosporilor, chiştilor, sclerotiilor etc., al căror rol este de a rezista presiunilor din mediu, şi moleculele paleobiochimice din fosile, care sînt considerate ca inaccesibile atacului microorganismelor (Burns, 1983).

**Succesiuni de microorganisme în procesele degradative.** Degradarea materiei organice în sol este realizată, cel mai adesea, de o serie de microorganisme (bacterii şi fungi) care se succed în funcţie de modificările materialului originar.

*Tabelul nr. 45*

**Substanțe recalcitrante prezente în sol și microorganismele care le degradează**

| Compusul | Microorganismele | Compusul | Microorganismele |
|---|---|---|---|
| Cutina | *Bacillus subtilis*<br>*Streptomyces* sp.<br>*Penicillium spinulosum*<br>*Rhodotorula* sp.<br>*Mortierella marburgensis* | Chitina | *Bacillus* sp.<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Clostridium* sp.<br>*Streptomyces* sp.<br>*Nocardia* sp.<br>*Mortierella* sp.<br>*Trichoderma* sp. |
| Lignina | *Arthrobacter* sp.<br>*Flavobacterium* sp.<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Phanerochaete oxysporum*<br>*Polyporus* sp.<br>*Poria* sp.<br>*Pleurotus* sp.<br>*Schyzophyllum* | Acidul humic | *Penicillium frequentaris*<br>*Penicillium luteum*<br>*Polystictus* |
| Taninuri | *Aspergillus* sp.<br>*Penicillium* sp. | Acidul fulvic | *Poria subacida* |
| | | Simazina (erbicid) | *Bacillus* sp.<br>*Streptomyces* sp.<br>*Aspergillus fumigatus*<br>*Fusarium* sp. |

Marea diversitate a materiilor organice, atît sub raportul structurii lor fizice, cît și al arhitecturii chimice, nu permit stabilirea unui model general de biodegradare, ca și de evenimente succesionale sub raportul microorganismelor active.

În cazul *materialelor vegetale* este cert că primele populații care le atacă după depunerea lor pe sol sînt bacteriile și fungii prezenți pe suprafața frunzelor înainte de a muri. În general, microorganismele alohtone nu supraviețuiesc competiției cu cele din sol care, în scurt timp, le înlocuiesc. Între acestea, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. și microfungii zimogeni („Sugar fungi"), *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichoderma* și *Aspergillus* cu mare putere competitivă. Pe măsură ce aceștia consumă materialele ușor utilizabile, mediul devine acid datorită imobilizării cationilor. Apar din nou unele bacterii ca actinomicetele, *Corynebacterium* sp., *Cytophaga*, *Myxobacteria* etc. Unele dintre ele pot ataca și liza hifele fungice, care au invadat inițial substratul. Un număr mare de bacterii sînt ingerate de protozoare, al căror număr crește temporar. În general, diversitatea speciilor de bacterii și de fungi scade pe măsură ce materialul este degradat. Final, cînd substratul este în mare măsură degradat, intervin microorganismele autohtone, care desăvîrșesc mineralizarea lui.

Succesiunile sînt rar invazii uniforme pe un întreg substrat. În cazul unei frunze, cuticula intactă reprezintă temporar o barieră pentru invazie, în timp ce părțile lezate sau bolnave sînt colonizate foarte ușor. Se dezvoltă un mozaic de localizări, în care diferitele regiuni ale frunzei sînt în diferite stadii de atac de către diferiți colonizatori.

Un caz particular este relevat de Kendrick și Burges (1962), care au urmărit secvența de colonizare a acelor de la *Pinus sylvestris*. Atacul este inițiat cu cîteva luni înainte ca acele să cadă pe pămînt și este realizat de bacterii și fungi saprofiți și paraziți. Între aceștia, primii invadatori care atacă structura acelor sînt: *Coniosporum*, *Fusicoccum*, *Pullularia* și *Lophodermium* a căror acțiune continuă și pe sol (fig. 11). Intensitatea atacului lor determină gradul de dezvoltare al miceliului altor fungi ca: *Helicoma* și *Sympodiella*, care acoperă suprafața acelor, și *Desmazierella*, care atacă țesuturile interne ale acestuia.

După o dezvoltare masivă vegetativă, fungii produc un număr mare de conidiofori. Acest val de sporulare apare cam la 6 luni de la căderea acelor pe sol și este urmat de o activitate intensă a acarienilor și colembolelor, care consumă sporii și o mare parte din miceliul superficial. După un an apare un al doilea val de sporulare cu producere masivă de conidiofori, la rîndul său urmat de alt val de activitate a acarienilor și colembolelor. Porțiuni foarte mari din ace și fragmente de litieră însă nu sînt atacate de microorganisme. Pe măsură ce primele ace sînt îngropate de căderea altora micromediul devine mai umed, țesuturile vegetale devin aparent mai moi, iar colembolele și acarienii consumă atît țesutul invadat de microorganisme, cît și pe cel neinvadat.

În urma activității animale, resturile de ace, sporii și hifele fungice, asociate cu exoscheletele meiofaunei și cu dejecțiile formează o masă de culoare închisă la joncțiunea dintre litieră și solul normal. În acest strat intră în acțiune fungi ca *Mortierella*, *Trichoderma*, *Penicillium* ș.a. Continuă degradarea celulozei, ligninelor. Unii fungi descompun chitina prezentă în proporție mare în acest orizont (Gray și Bell, 1963).

În procesul de degradare a acelor de *Pinus sylvestris*, rolul major revine fungilor și faunei. Bacteriile au un rol comparativ mai mic, datorită caracterului acid (pH 3,0—4,0) al litierei și efectelor inhibitoare ale unor compuși fenolici din litiera de pin. Burges (1966) apreciază că în condițiile proprii pădurilor de pin din Anglia, descompunerea unui ac individual la un stadiu la care să nu mai fie recunoscut necesită 8—9 ani. El apreciază că o situație de echilibru în straturile unei litiere de pin necesită aproximativ 10 ani.

## INTERACȚIUNI MICROORGANISME — PLANTE

**„Studiul interacțiunilor dintre plante și microorganisme a adus informații recente care promit un beneficiu considerabil pentru agricultură".**

N. T. KEEN
B. STASKAWICZ

Microorganismele reprezintă unul din componentele cele mai dinamice ale solului, căruia, împreună cu celelalte organisme, îi conferă caracterul de corp animat cu organizare complexă, unul din situsurile cele mai dinamice de interacțiune din natură. Ele determină modificări profunde fizicochimice și arhitecturale, precum și transformări continue ale materiei organice și anorganice, care asigură, în ultimă instanță, potențialul de fertilitate datorită căruia solul devine favorabil dezvoltării plantelor.

# INTERACȚIUNI ÎNTRE RĂDĂCINILE PLANTELOR ȘI MICROORGANISMELE DIN SOL

## RIZOSFERA

**„Rădăcina reprezintă pentru plantele terestre o zonă critică și sediul unor intense activități chimice și biologice".**

R. STARKEY

Ideea că suprafața și regiunile apropiate de rădăcini reprezintă microhabitate specializate pentru microorganismele din sol a fost sugerată de Reider (1947), care a descris colonizarea rădăcinilor unor angiosperme de către hifele fungice. Caracterul universal al asocierilor mai mult sau mai puțin intime dintre microorganisme și rădăcini a fost stabilit după observarea altor relații cum sînt nodozitățile leguminoaselor, micorizele arborilor de pădure, precum și cele din rizosferă.

Descrisă de Hiltner (1904), ca regiunea din sol în care microorganismele sînt expuse influențelor specifice ale rădăcinilor plantei, rizosfera este și în prezent definită cu ambiguitate.

Thom și Smith (1931) o caracterizează drept „regiunea din sol care conține rădăcinile unei plante și microorganismele care le însoțesc".

Pornind de la observația că „spălarea" cu diferite grade de agitare a rădăcinilor unei plante scoasă cu menajament din pămînt evidențiază diferențe importante în caracteristica diferitelor regiuni, rizosfera a fost definită ca stratul de sol ce aderă de sistemul radicular după agitarea ușoară, care îndepărtează solul legat lax.

Încercările de a defini mai riguros zonele de influență ale rădăcinilor au dus la crearea unor termeni ca „rizosfera internă" sau „suprafața rădăcinii" etc., fiecare avînd limite proximale și distale.

În același spirit a fost creat și termenul de *rizoplan* pentru a defini ceea ce rămîne legat ferm de rădăcini după o agitare puternică în apă sterilă pentru a îndepărta solul strîns aderent. Pentru alți cercetători, rizoplanul reprezintă „habitatul sau nișa ecologică furnizată de suprafața rădăcinii", deci nu o zonă din jurul rădăcinii, ci însăși suprafața ei. Astfel definit, conceptul de rizoplan ignoră faptul că microorganismele nu sînt dispuse pe suprafața rădăcinii într-un singur plan — ca un monostrat — și că, cel puțin în anumite regiuni, formează straturi de mai multe celule înainte de a veni în contact cu solul. În plus, în unele cazuri, rizoplanul se extinde și în structura rădăcinii, deoarece frecvent epiderma și celulele corticale sînt lezate, favorizînd pătrunderea și localizarea microorganismelor din rizoplan.

Practica a demonstrat că atît determinarea rizosferei, prin agitare moderată, cît și a rizoplanului prin agitare viguroasă a rădăcinilor într-un diluant se însoțesc de îndepărtarea a numeroase microorganisme din mediile respective, odată cu particulele de sol*.

După o definiție fiziologică, rizosfera ar fi regiunea din solul periradicular în care se resimt efectele substanțelor exsudate de plantă, care realizează așa-numitul „efect de rizosferă". Dowling și Brougton (1986) consideră, în

* După Campbell (1977), microorganismele din rizoplan pot fi îndepărtate numai după agitare viguroasă cu perle de sticlă, timp de 10 — 15 minute.

mod arbitrar, că această zonă se poate extinde 2 cm de la suprafața rădăcinii în teritoriul bogat în nutrienți (aminoacizi, glucide, vitamine), pentru care competiționează microorganismele permanente din sol.

În realitate, situația este mult mai complexă. Limitele rizosferei depind nu numai de cantitatea de substanțe exsudate din rădăcini, ci și de proprietățile fizice și chimice ale solului, care afectează difuzia lor, ca și de numărul și natura microorganismelor. Dacă microorganismele din rizoplan sînt abundente, ele pot consuma cantități mai mari de substanțe exsudate și gradul de extindere al efectului de rizosferă este limitat. Invers, în cazul unei plante cultivate în sol nisipos, cu puține microorganisme, rizosfera poate avea mai mulți centimetri. În plus, în solul bogat în substanțe organice, spre deosebire de solul sărac, efectul de rizosferă nu este resimțit. Ca urmare, o plantă care produce un exsudat modest din punct de vedere cantitativ, într-un sol bogat în substanțe organice, are o rizosferă de fracțiuni de milimetru sau chiar de micrometri, coincizînd cu rizoplanul.

În concluzie se poate spune că rizosfera nu este un teritoriu uniform, bine definit, ci o regiune periradiculară, care conține un gradient de microorganisme și de activități mai importante în solul adiacent sistemului radicular, diminuînd progresiv pe măsură ce distanța față de acesta crește. Este evident că gradul lor de extindere depinde și de natura solului, care poate influența difuzia substanțelor produse de rădăcinile plantelor. Gradul de extindere a rizosferei depinde și de structura sistemului radicular. Astfel, sistemul radicular al unei singure plante de grîu poate fi lung de 200 m. Presupunînd o grosime medie de 0,1 mm, poate rezulta un rizoplan de 6 m$^2$ (Atlas și Bartha, 1987). Cînd rădăcinile sînt foarte dense, tot solul din jurul lor ste afectat de efectul de rizosferă.

Wallstein, Bruening și Bollen (1979) au descris existența unei structuri caracteristice periradiculare pe care au numit-o *rizoteacă*(„Rhyzosheath"). Evidențiată inițial la unele ierburi din regiuni de deșert, este prezentă și la plante care cresc în regiuni cu climă moderată. La *Secale cereale*, ea se prezintă sub forma unor cilindri groși de sol, care aderă de rădăcini și în care particulele de nisip sînt cimentate de un mucigel extracelular excretat, probabil, de celulele radiculare. Considerată ca o adaptare pentru menținerea umidității și, probabil, sediul unor microorganisme fixatoare de azot, rizoteaca reprezintă o extensie a zonei de interacțiuni maxime dintre microorganisme și plante (Duell și Peacock, 1985; Atlas și Bartha, 1987).

### Distribuția microorganismelor pe rădăcinile plantelor

Studiile efectuate pe plante cultivate pe medii lichide sau în nisip sugerau că aproape întreaga suprafață a rădăcinii este acoperită de microorganisme, care formează un compartiment continuu periradicular, ca un manșon, ce separă complet rădăcina de sol.

Lewis (1973), precum și Bowen și Theodorou (1973) au demonstrat că, cu excepția micorizelor, la care hifele fungice acoperă complet rădăcinile scurte laterale, relația dintre microorganisme și rădăcini este diferită, colonizarea acestora avînd un caracter discontinuu. Astfel, la *Pinus radiata*, segmentele radiculare mai vechi de 20 de zile sînt acoperite de microorganisme în proporție mai mică, de 10%, iar cele vechi de 90 de zile, în proporție de 37%. Cele cu o vîrstă de 2—3 zile conțin foarte puține microorganisme. Într-un studiu efectuat pe opt plante cultivate în sol fertil, Rovira (1976)

a demonstrat că suprafața colonizată de microorganisme variază între 4 și 10% (ea a fost de 6,6% la *Plantago lanceolata* și 7,7 la *Lolium perenne*).

Microorganismele sînt cel mai adesea, grupate în mici agregate a căror așezare nu este aleatorie. Ele colonizează, de preferință, joncțiunile celulelor epidermice, care reprezintă situsurile la nivelul cărora eliberarea de exsudat este maximă. Prin aceasta, ele sînt nu numai zone care favorizează creșterea microorganismelor, ci și teritorii de la nivelul cărora are loc migrarea microorganismelor de-a lungul rădăcinii. La nivelul lor, pe rădăcinile de *Eucalyptus calophyla*, numărul bacteriilor este de 50 de ori mai mare decît în alte regiuni ale rădăcinii.

Urmărind dinamica procesului de colonizare a rădăcinilor, Bowen și Rovira (1976) au demonstrat existența unei corelații între apariția microcoloniilor și prezența unor resturi de materie organică, care ar fi sursa majoră de inoculum. Relația ar favoriza colonizarea unor bacterii heterotrofe, asociate frecvent cu substanțe organice, cum sînt, spre exemplu, speciile de *Pseudomonas*, dar și unii patogeni. S-a observat, de asemenea, că în primele zile, numărul microorganismelor dezvoltate pe rădăcini este foarte mic, ceea ce reprezintă un dezavantaj în interacțiunea cu unii patogeni, care se deplasează ușor și infectează rapid.

Numărul foarte mic de microorganisme prezente în fazele inițiale ale colonizării rădăcinilor pare surprinzător, ținînd seama de numărul lor foarte mare din sol. În realitate, discrepanța este numai aparentă: ea se explică prin lipsa de uniformitate a răspîndirii microorganismelor în sol, prezente mai puțin în stare liberă și cel mai adesea în microcolonii.

Microscopia electronică a interfeței sol/rădăcină a evidențiat faptul că bacteriile care se dezvoltă pe rizoplan, izolate sau ca microcolonii, sînt inclavate într-un mucigel cu grosimea de 1—10 μm. În interiorul lui, bacteriile sînt adesea înconjurate de zone clare, electrontransparente, cu grosimea de 1—2 μm. Mucigelul, de natură polizaharidică, cu componenți fenolici și structură granulară sau fibrilară, este repartizat inegal, fiind depus în straturi mai groase la joncțiunea celulelor epidermice și în zona de creștere a rădăcinilor. Este prezent și pe rădăcinile plantelor cultivate axenic — ceea ce demonstrează că este produs de acestea, dar este mai abundent în mediile nesterile, unde se adaugă și polizaharidele capsulare bacteriene. Mucigelul protejează părțile mai tinere ale rădăcinilor de desicație și influențează procesul de difuzie a nutrienților din exsudate. Cel localizat în regiunea apicală servește ca lubrefiant pentru rădăcinile care cresc în sol.

Bowen și Rovira (1976) evidențiază faptul că frecvent bacteriile de pe rădăcinile plantelor sînt asociate cu hifele fungilor. Această particularitate ar putea avea mai multe explicații:

1) ocuparea de ambele tipuri de microorganisme a unor zone bogate în surse de C, N și energie;

2) creșterea bacteriilor ar fi stimulată de substanțe exsudate din hife;

3) prezența fungilor ar favoriza producerea de exsudate radiculare;

4) bacteriile ar migra de-a lungul peliculei de apă, aflată la interfața dintre hife și celulele radiculare.

### Viteza de multiplicare a microorganismelor pe rădăcini

Dinamica de creștere a bacteriilor pe suprafața rădăcinilor este foarte diferită de cea observată în laborator. După Bowen și Rovira (1976), posibilitățile rădăcinilor de a asigura creșterea bacteriilor pot fi definite în raport de doi parametri:

1) de disponibilitatea de substanțe pentru creștere (nutrienți, exsudate, celule descuamate), respectiv de ,,factorul intensitate'', apreciat prin timpul de generație (TG) și

2) prin ,,factorul capacitate'', respectiv prin aportul de materiale energetice de la rădăcini, care determină biomasa microbiană totală de pe rădăcină.

La plantele tinere de *Pinus radiata*, bacteriile din rizosferă se multiplică după două zile logaritmic, pînă cînd densitatea lor ajunge la $10^4$ — $10^5$ bacterii/mm$^2$ (după aproximativ patru zile). Apoi intră într-o fază staționară, cînd eliberarea de exsudate echilibrează nevoile de menținere ale populației. Ulterior, populația va crește lent, pe măsură ce celulele migrează în zone învecinate ale rădăcinii încă necolonizate. Ritmul de multiplicare este mai lent decît în laborator, dar, oricum, mai scăzut decît în solul lipsit de rădăcini. Efectul stimulator al rădăcinilor de *Pinus radiata* este evident prin scurtarea timpului de generație la *Pseudomonas* sp. la 5,2 ore față de 77 de ore în solul necultivat și mai puțin marcat la *Bacillus* sp., la care TG în rizosferă este de 39 de ore față de peste 100 de ore în solul necultivat.

## EFECTUL RĂDĂCINILOR ASUPRA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME DIN RIZOSFERĂ

Interacțiunile dintre microorganisme și rădăcini satisfac importante exigențe nutriționale ale ambilor parteneri. Ele au un caracter complex și sînt bazate în mare parte pe modificarea mediului natural reprezentat de sol, eliberarea de compuși organici din rădăcini, producerea de către microorganisme a unor factori de creștere sau disponibilizarea de nutrienți minerali etc.

**Efectul de rizosferă.** Regiunile periradiculare sînt populate în mod preferențial de comunități extrem de numeroase și de active de microorganisme. Efectul stimulator este maxim pe rizoplan, unde se găsesc și cele mai numeroase microorganisme, și scade treptat spre numărul caracteristic solului normal pe măsură ce distanța față de rădăcină crește (tabelul nr. 46).

Harley (1971) remarcă în plus un pronunțat caracter de selectivitate, decurgînd din prezența în special a unor microorganisme care necesită substanțe speciale pentru creștere (aminoacizi, vitamine, factori de creștere etc.); diferențele dintre microorganismele din rizosferă și cele din solul lipsit de rădăcini sînt atît de mari, încît nu pot fi explicate decît prin existența unui mediu local cu totul aparte pentru microorganisme (Macura, 1963). Fenomenul este determinat de faptul că rădăcinile eliberează un exsudat, cu o compoziție complexă, răspunzător de rolul stimulator, descris sub denumirea de *efect de rizosferă*.

*Compoziția chimică a exsudatului.* Între substanțele cel mai frecvent întîlnite sînt următoarele:

*Glucide:* glucoză, fructoză, xiloză, maltoză, ramnoză, rafinoză, arabinoză, zaharoză.

41—c 757

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

*Tabelul nr. 46*

**Efectul distanței față de suprafața rădăcinii asupra microorganismelor rizosferei de *Lupinus***

(după Papavisas și Davey, 1961)

| Distanța de la rădăcină (mm) | Milioane/g (greutate uscată) | | | Mii/g (greutate uscată) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Bacterii * | *Streptomycetes* | Fungi | *Cylindrocarpon radicicola* | *Paecilomyces marguandi* | *Fusarium oxysporum* | *Trichoderma viride* |
| Rizoplan = 0 | 159,0 | 46,7 | 355 | 4,9 | 9,0 | 5,3 | 5,9 |
| 0— 3 | 49,7 | 15,5 | 170 | 0 | 2,8 | 2,5 | 22,1 |
| 3— 6 | 38,0 | 11,4 | 170 | 0 | 1,6 | 2,8 | 6,9 |
| 9—12 | 37,4 | 11,8 | 130 | 0 | 1,5 | 4,5 | 14,9 |
| 15—18 | 34,2 | 10,1 | 117 | 0 | 0 | 4,1 | 7,3 |
| Martor = 80 | 27,3 | 9,1 | 91 | 0 | 0 | 5,1 | 11,1 |

* Fără actinomicete.

*Aminoacizi:* alanină, acizi aspartic și glutamic, glicocol, leucină, valină și serină (cel mai frecvent), iar la unele plante și/sau prolină, fenilalanină, cisteină, metionină, lizină, triptofan și treonină (Clark, 1966). Nu se cunosc factorii care determină aceste deosebiri în compoziția exsudatelor în aminoacizi.

*Acizi organici:* acizii acetic, propionic, butiric, oxalic, citric, tartric, fumaric, glicolic, malic, succinic etc.

*Vitamine:* biotină, tiamină, niacină, acid pantotenic, piridoxină, mezoinozitol.

*Factori de creștere:* auxine etc.

Au mai fost evidențiate la anumite plante diferiți alcaloizi, fosfatide, flavone, taninuri, substanțe care inhibă creșterea microorganismelor (alcooli, acetaldehide etc.) (Rovira, Foster și Martin, 1979).

În unele cazuri, regiunile de creștere ale rădăcinilor eliberează substanțe cu efect chimiotactic, care atrag zoosporii unor fungi fitopatogeni ce se acumulează în regiunea respectivă, germinează, induc o leziune locală și declanșează boala.

În plus, rădăcinile eliberează o serie de mucigeluri (mucilagii modificate probabil de acțiunea microorganismelor) și de constituenți rezultați din liza celulelor senescente sau indusă de microorganisme.

Campbell (1977) semnalează posibilitatea eliberării prin exsudate a unor substanțe de sinteză (erbicide, nematocide, antibiotice), care, după pulverizarea pe frunze, au fost translocate în rădăcină. În general, substanțele din exsudate sînt ușor accesibile microorganismelor, fapt care explică dezvoltarea lor masivă și rapidă. Cantitatea și calitatea exsudatelor sînt afectate de specie, vîrstă și starea fiziologică a plantei, precum și de factorii de mediu (temperatură, intensitatea iluminării, leziunile radiculare, vestejirea temporară etc.).

Figura 242 prezintă efectul vîrstei plantei asupra microorganismelor din rizosferă. El este maxim în cursul perioadei timpurii de înflorire. Adeseori

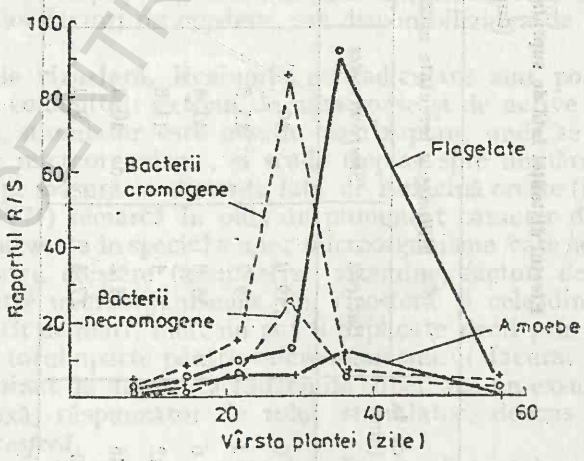



Fig. 242. — Creșterea numărului bacteriilor și al protozoarelor în rizosfera de *Sinapis alba* (muștar alb). Raportul R : S este înregistrat în funcție de vîrsta plantelor. Efectul maxim al rizosferei asupra protozoarelor este mai tardiv decît asupra bacteriilor (după Darbyshire și Greaves, 1967).

însă, acest efect nu este corelat cu vîrsta cronologică, ci, mai degrabă, cu cea fiziologică a plantei. Compoziția chimică a exsudatelor variază nu numai între specii, ci chiar între varietăți (Scheffer și colab., 1964). Cantitatea de exsudat determină mărirea comunităților microbiene, iar calitatea lui, natura microorganismelor asociate, caracteristice în mare măsură plantei-gazdă. Datele privind cinetica sintezei exsudatelor, precum și a cantităților eliberate sînt destul de fragmentare.

Prezența microorganismelor stimulează producerea de exsudate. Lucrînd cu plante de grîu și orz marcate cu $^{14}CO_2$, Barber și Martin (1976) au arătat că ele eliberează 8% din carbonul total în solul nisipos steril și 15% în condiții lipsite de sterilitate. În solul normal fertil, care conține o mai mare densitate și diversitate de microorganisme, cantitatea de C eliberat în exsudate este de 5—20 ori mai mare decît în culturile hidroponice aseptice. Barbe și Gunn (1974) au evidențiat rolul factorilor mecanici: cantitatea de substanțe organice exsudate din rădăcini în sol este mai mult decît dublă decît cea din culturi hidroponice. Situsul major al exsudării ar fi porțiunea din rădăcină care crește (1—3 cm de la apex), dar exsudatul ar fi produs și de regiunile mai vechi, ca și de rădăcinile laterale, active la extremitatea lor liberă (Brown, 1975).

După Bowen și Rovira (1976), substanțele difuzibile din exsudat ar fi eliberate de-a lungul întregii rădăcini, în timp ce compușii nedifuzibili ar fi eliberați, în special, în regiunea apexului radicular. Rădăcinile bătrîne sau moarte asigură dezvoltarea unor micropopulații bogate și variate, diferite de cele care colonizează rădăcinile tinere.

**Microbiota rizosferei**

Rizosfera stimulează multiplicarea bacteriilor și a fungilor. Utilizînd un model de simulare a difuziei substratelor organice, Newman și Watson (1977) au arătat că unei diferențe de zece ori în exsudare îi corespunde o diferență de o sută de ori în abundența microorganismelor. Algele și protozoarele nu sînt stimulate direct, dar numărul lor crește deoarece bacteriile furnizează cantități sporite de nutrienți. Experimental, Bowen și Rovira (1973) au demonstrat că rădăcinile intacte pot exsuda material organic suficient pentru a hrăni mari populații de microorganisme. Rădăcinile grîului de 2—8 săptămîni cultivat în cîmp asigură substanțele organice necesare pentru $1{,}5 \times 10^6$ bacterii per mg de rădăcină uscată.

**Bacteriile** din rizosferă sînt reprezentate de o mare proporție de bacili Gram-negativi și un număr mai mic de coci, bacili și forme pleomorfe Gram-pozitive. Bacteriile cromogene sînt mai numeroase decît cele incolore. Cauzele acestui fenomen nu sînt elucidate.

Între speciile identificate ca predominante sînt de menționat cele din genurile: *Achromobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Corynebacterium, Pseudomonas, Rhizobium, Xanthomonas* etc. *Azotobacter chroococcum* este absent sau, contrar datelor mai vechi, puțin numeros. În schimb, bacteriile *A. paspali* și *Azospirillum* sp. sînt frecvent asociate cu rizosfera unor ierburi tropicale.

Numărul bacteriilor prezente în rizosferă este estimat la $5 \times 10^6$—$1 \times 10^9$ celule/g, iar cel al celor din rizoplan la mai multe miliarde/g. Datorită dificultăților de cuantificare a numărului microorganismelor din rizosferă s-a produs estimarea influenței acesteia, sub forma unui raport între numărul microorganismelor din rizosferă (R) față de cel din solul din zone înde-

părtate de rădăcini (S). Raportul $\frac{R}{S}$ variază, după Clark (1966), existînd între 10 și 25 de ori mai multe microorganisme în rizosferă decît în solul fără rădăcini. El poate fi egal cu 50 la leguminoase și poate ajunge, în situații excepționale, la unele plante, la valori mai ridicate $\left(\frac{R}{S} = 100 - 200\right)$. Astfel, *Agrobacterium radiobacter* este prezent în solul fără rădăcini în număr de $2 \times 10^4$/g, iar în rizosferă de $1{,}4 \times 10^7$/g. Modificări importante ale raportului $\frac{R}{S}$ se observă în cazul unor grupuri fiziologice de bacterii (tabelul nr. 47) cum sînt cele denitrificatoare $\left(\frac{R}{S} = 1\,260\right)$, amonificatoare (125) etc.

Raportul $\frac{R}{S}$ este expus unor erori, care adesea sînt ignorate. Microorganismele care cresc mai repede sub influența substanțelor nutritive eliberate de rădăcini sînt mai numeroase în culturi, ceea ce face ca raportul să fie supraestimat.

**Fungii** din rizosferă sînt reprezentați de *Mucorales* localizați în zonele de influență a exsudatelor și de diferiți descompunători ai celulozei. În rizoplan predomină cîteva genuri, ca *Fusarium* și *Rhizoctonia*. În general, fungii

*Tabelul nr. 47*

**Variația numerică a diferitelor categorii de microorganisme în rizosfera de grîu comparativ cu solul lipsit de rădăcini** (după Rouatt, Katznelson și Payne, 1960)

| Microorganismele | Număr per g greutate uscată | | Raportul R : S |
|---|---|---|---|
| | Sol de rizosferă | Sol martor | |
| GRUPURI TAXONOMICE MAJORE | | | |
| Bacterii (exclusiv actinomicete) | $1200 \times 10^6$ | $50 \times 10^6$ | 240,0 |
| Actinomicete | $46 \times 10^6$ | $7 \times 10^6$ | 6,6 |
| Fungi | $12 \times 10^5$ | $1 \times 10^5$ | 12,0 |
| Alge | $5 \times 10^3$ | $27 \times 10^3$ | 0,2 |
| Protozoare | $24 \times 10^2$ | $10 \times 10^2$ | 2,4 |
| GRUPURI FIZIOLOGICE DE BACTERII | | | |
| Amonificatoare | $500 \times 10^6$ | $4 \times 10^6$ | 125,0 |
| Anaerobe producătoare de gaze | $39 \times 10^4$ | $3 \times 10^4$ | 13,00 |
| Anaerobe | $12 \times 10^6$ | $6 \times 10^6$ | 2,0 |
| Denitrificatoare | $126 \times 10^6$ | $1 \times 10^5$ | 1260,0 |
| Celulozolitice aerobe | $7 \times 10^5$ | $1 \times 10^5$ | 7,0 |
| Celulozolitice anaerobe | $9 \times 10^3$ | $3 \times 10^3$ NS | 3,0 |
| Bacterii sporogene | $9 \times 10^5$ | $6 \times 10^5$ NS | 1,5 |
| *Azotobacter* sp. | $17 \times 10^6$ | $< 1 \times 10^4$ | — |

NS = nesemnificativ

sînt dispuși discontinuu, sub formă de populații distincte, la distanțe diferite de vîrful rădăcinii care crește.

Rolul stimulator al rizosferei este deosebit de important pentru activitatea microfungilor din sol. După cum este demonstrat, solul liber de rădăcini, datorită fenomenului încă enigmatic de fungistază, nu le asigură decît supraviețuirea sub formă de spori (Brown, 1975).

**Algele** nu suferă influențe semnificative și sînt lipsite de importanță.

**Protozoarele** cresc în rizosferă, probabil, datorită numărului mare de bacterii-pradă (creșterea lor este masivă după ce bacteriile au ajuns la valori maxime).

## EFECTELE MICROORGANISMELOR ASUPRA PLANTELOR

Deși unele aspecte ale interacțiunii dintre microorganisme și plante sînt încă necunoscute sau controversate, numeroase observații pledează pentru o serie de efecte benefice, fără a exclude, în anumite cazuri, posibilitatea unor consecințe negative. Plantele dezvoltate în solul obișnuit, nesteril, sînt mai viguroase, iar producția de masă vegetală verde și uscată este mai mare decît a plantelor-martor cultivate în solul steril.

### Rolul în nutriția plantelor

Microorganismele facilitează sau participă la absorbția nutrienților din sol, în special cînd aceștia sînt limitanți pentru creștere. Ele desfășoară permanent o acțiune de reciclare și solubilizare a nutrienților minerali, intensificată de „efectul de rizosferă".

Plantele cultivate în mediu steril și inoculate cu microorganisme din rizosfera de orz sau de muștar absorb mai mulți compuși ai N, K, P, Na, Ca și Mg decît plantele-martor, menținute în mediu steril. Această proprietate a fost descrisă și pentru Zn, Mn, Mo și Al, în timp ce absorbția stronțiului și a rubidiului este inhibată. În plus, microorganismele solubilizează cantități importante de compuși minerali și degradează substanțele organice, facilitînd acumularea de compuși accesibili plantelor.

Microorganismele din rizosferă au o influență benefică asupra nutriției cu fosfor. Katznelson (1965) a evidențiat în rizosfera mai multor specii de plante, numeroase microorganisme care solubilizează fosforul din fosfați[9] organici și anorganici insolubili. De asemenea, microorganismele din rizosferă măresc solubilitatea compușilor Fe, prin producerea de agenți chelatori organici, precum și viteza de preluare a Ca, a cărui solubilitate este mărită prin producerea de $CO_2$ în rizosferă. Interacțiunile nutriționale cel mai bine cunoscute sînt cele din asociațiile simbiotice, de tipul celor fixatoare de $N_2$ sau al micorizelor.

Fungii de micorize exercită un efect benefic complex prin:

1) ramificarea și îngroșarea rădăcinilor care măresc regiunea de suprafață;

2) dezvoltarea extensivă a hifelor care explorează un volum foarte mare de sol;

3) capacitatea superioară a hifelor de a îngloba nutrienții prezenți în concentrații foarte mici;

4) rădăcinile cu micorize au o viață mai îndelungată și sînt mai puțin sensibile la boli decît cele neinfectate;

5) micorizele ectotrofe au propria lor rizosferă și un raport $\frac{R}{S}$ mult mai mare decît cel al rădăcinilor neinfectate.

Rezultatul acestor acțiuni complexe este că rădăcinile plantelor cu micorize conțin de două ori mai mult fosfat decît cele fără, iar cantitatea de fosfor translocată în plante este de 20 de ori mai mare (Barber, 1966). Plantele care cresc în solurile inundate beneficiază atît de participarea microorganismelor, cît și de unele adaptări care asigură transferul oxigenului din plantă în rădăcini. Mediile respective sînt anaerobe și plantele se confruntă cu prezența $H_2S$, rezultat din reducerea sulfaților. Orezul și probabil și alte plante, parțial submerse, sînt protejate de efectul toxic al $H_2S$ prin asocierea mutualistă cu bacteria filamentoasă microaerofilă *Beggiatoa*. Aceasta beneficiază de oxigenul și de sistemul catalazic furnizat de rădăcinile plantei și, la rîndul său, ajută planta, prin oxidarea $H_2S$ la sulfat sau la S° inofensiv, protejînd sistemul citocromic radicular.

### Efectul metaboliților microbieni

Rădăcinile sînt permanent expuse influenței diferiților stimulatori și inhibitori produși în cursul metabolismului microbian, care acționează sinergic ca regulatori de creștere. Sistemul radicular al plantelor din solul nesteril este mai bogat decît cel al plantelor cu rădăcini sterile, are mai multe rădăcini laterale și mai mulți peri radiculari. Plantele respective cresc mai repede, sînt mai verzi, înflorirea este grăbită și apariția fructelor mai timpurie. Aceste efecte stimulatoare pot fi produse și cu filtratul unor bacterii din rizosferă (Hirota, 1982; Kimura, Hamasaki și Nakajima, 1982; Sobieszczanski, 1986).

Astfel, bacteriile *Pseudomonas aurantiaca*, *P. fluorescens*, *P. radiobacter* și *Bacterium herbicicola* produc o serie de vitamine ca tiamina, biotina, riboflavina și acidul pantotenic. Numeroase bacterii din rizosferă produc acid indolil-3-acetic (AIA), în special cînd triptofanul este prezent în mediu. Brown (1975) a demonstrat că bacteriile din rizosfera plantelor tinere de grîu produc 0,02—0,03 mg AIA/ml în absența triptofanului și 1,0—10,0 mg/ml în prezența lui. Aceste bacterii sînt rare în rizosfera plantelor bătrîne, probabil ca rezultat al scăderii producerii de exsudat radicular, dar, în același timp, și ca rezultat al unei nevoi scăzute de hormon de creștere pentru plantă. De asemenea, numeroase bacterii (inclusiv actinomicete), levuri și unii fungi (*Fusarium* sp.) produc acid giberelic și gibereline cu efecte stimulatoare asupra creșterii plantelor (măresc viteza de germinare a semințelor, asigură dezvoltarea sistemului radicular etc.).

Microorganismele realizează și un efect de epurare a mediului periradicular prin degradarea pesticidelor și îndepărtarea cantităților excesive de substanțe organice și anorganice.

### Efecte negative

Microorganismele din rizosferă pot exercita și unele efecte negative asupra plantelor cînd competiționează pentru nutrienți minerali sau pentru oxigen, cînd interferă cu absorbția nutrienților, cînd intensifică activitatea unor agenți patogeni sau cînd produc substanțe fitotoxice (Clark, 1966).

Competiția pentru nutrienți a fost descrisă în cazul mai multor elemente și pare să aibă un caracter general în funcție de condițiile locale. Ea poate crea un deficit de minerale necesare plantelor. Astfel, imobilizarea Zn și oxidarea Mn de către bacterii pot determina boli ale pomilor fructiferi („Little leaf") sau ale ovăzului („Grey speck"). Populațiile abundente de microorganisme din rizosferă pot determina și deficit de N, cînd acest element este limitant sau cînd este administrat ca fertilizator. În aceste cazuri, azotul este în parte imobilizat în proteinele celulare ale microorganismelor și în parte pierdut prin denitrificare.

În categoria efectelor negative se înscriu și cazurile de potențare a patogenității unor agenți patogeni puțin virulenți. Kerr (1963), lucrînd cu *Pythium ultimum* și *Fusarium oxysporus* f.s. *pisi*, a găsit că fiecare în parte produce numai simptome ușoare, în timp ce împreună declanșează îmbolnăviri tipice (ofilirea mazării). În mod asemănător, Flentje și Stretton (1964) a observat că *Thanatephorus cucumeris* produce leziuni minore la grîu în solul steril, în timp ce în solul normal produce leziuni rapid invadante, extensive.

Figura 243 prezintă un model conceptual simplu privind interacțiunile dintre microorganisme și plante (Bowen, 1980).

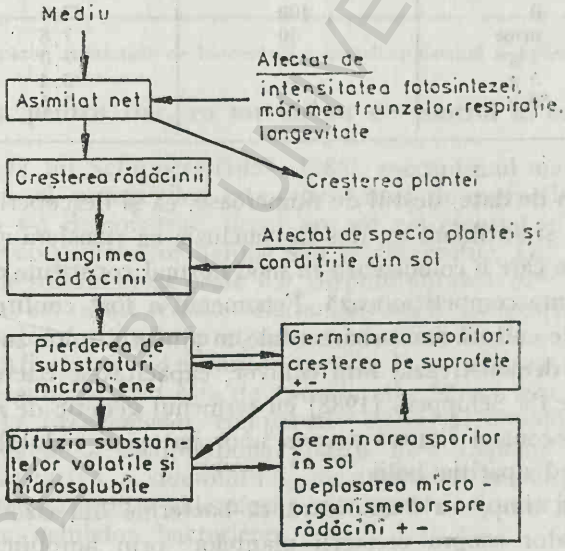



Fig. 243. — Model conceptual simplificat privind interacțiunile dintre plante și microorganisme în sol (după Bowen, 1980).

## Rolul microorganismelor din rizosferă în combaterea agenților patogeni pentru plante

Numeroase observații au demonstrat prezența microorganismelor patogene în regiunea rădăcinilor plantelor.

Într-un studiu riguros, Simmonds și Ledingham (1937) au demonstrat că peste 50% din fungii izolați din jurul rădăcinilor de grîu sînt potențial

paraziți și patogeni, nișa lor ecologică din regiunea radiculară reprezentînd un rezervor potențial de infecție. În același timp, s-a remarcat faptul că în condiții normale, deși prezente, microorganismele patogene nu infectează plantele. Fenomenul a fost confirmat experimental de Henry (1931), care a demonstrat că infecția plantelor cu patogeni din sol apare mai frecvent în solul sterilizat decît în cel nesterilizat. Adăugarea unei cantități infime de sol în care a germinat și a crescut grîul este suficientă pentru a asigura protecția plantelor față de un inoculum suficient de mare pentru a produce boala în solul sterilizat (tabelul nr. 48).

*Tabelul nr. 48*

**Efectul sterilizării solului asupra patogenității fungilor** *Helminthosporium sativum* (după Henry, 1931)

| Cantitatea de sol nesteril adăugat | Frecvența izolării agentului patogen în 100 de încercări | Frecvența infecțiilor (%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 47,6 |
| urme | 30 | 7,8 |
| 1 g | — | 7,0 |
| 5 g | — | 3,1 |
| 50 g | — | 3,5 |

Acest gen de date, destul de numeroase, ca și descoperirea fenomenelor de antagonism și antibioză au dus la concluzia că rizosfera și populațiile de microorganisme care o colonizează în mod normal constituie o barieră pentru patogenii cu care competiționează. Fenomenul a fost confirmat pentru mai multe plante de cultură sau ornamentale,cu ajutorul unor metode de studiu moderne, care demonstrează, fără echivoc, capacitatea bacteriilor din rizosferă, denumite de Schippers (1988) cu termenul generic de *rizobacterii*, de a exercita un biocontrol riguros asupra unor patogeni redutabili (tabelul nr. 49), împiedicînd apariția bolii.

În același timp, s-a demonstrat că bacteriile din rizosferă exercită și un rol stimulator asupra creșterii plantelor, prin amplificarea sistemului radicular, avînd drept consecință ameliorarea preluării apei și a nutrienților din sol.

*Mecanismele combaterii microorganismelor fitopatogene* sînt diferite și includ:

1) inhibarea germinării sporilor și a creșterii tubului germinativ, (demonstrat la *F. oxysporium* de Baker și colab. (1986).

2) limitarea activității patogene în țesutul radicular infectat *(G. graminis)*;

3) inducția rezistenței gazdei;

4) suprimarea microorganismelor nocive din spațiul rizosferic.

*Tabelul nr. 49*

**Bacterii din rizosferă, active în combaterea unor agenți patogeni pentru plante**

| Bacteria activă | Microorganismele patogene | Planta protejată | Autorii |
|---|---|---|---|
| *Alcaligenes* sp. | *Fusarium oxysporum* | Garoafă | Yen și Schroth (1986) |
| *Arthrobacter* | *Fusarium oxysporum* | Garoafă | Sneh (1981) |
| *Bacillus* sp. * | *Gaeumannomyces graminis* | Grîu | Capper și Campbell (1986) |
| *Bacillus* sp. * | *Phytophtora cactorum* | Măr | Gupta și Utkehde (1983) |
| *Bacillus* sp. | *Sclerotium cepivorum* | Ceapă | Utkehde și Rahe (1983) |
| *Enterobacter* sp. | *Phytophtora cactorum* | Măr | Gupta și Utkehde (1983) |
| *Hafnia* sp. | *Fusarium oxysporum* | Garoafă | Sneh și colab. (1985) |
| *Pseudomonas* sp. * | *Erwinia carotovora* | Cartof | Xu și Gross (1986) |
| *Pseudomonas sp.* * | *Pythium* sp. | Grîu | Weller și Cook (1986) |
| *Pseudomonas* sp. * | *Gaeumannomyces graminis* | Grîu | Weller și Cook (1986) |
| *Pseudomonas* sp. | *Rhizoctonia solani* | Bumbac | Howell și Stipanovi (1980) |
| *Pseudomonas* sp. | *Thielaviopsis basicola* | Tutun | Ahl și colab. (1986) |
| *Rhizobium* | *Phytophtora megasperma* | Soia | Tu (1978) |
| *Serratia* sp. | *Fusarium oxysporum* | Garoafă | Sneh și colab. (1985) |

* Bacterii a căror capacitate de biocontrol a fost demonstrată și în experiențe în cîmp.

## Competiția pentru fier, ca mecanism de control al bolilor plantelor

După datele lui Schippers (1987, 1988), mecanismul major implicat în controlul biologic al patogenilor este reprezentat de competiția pentru fier.

După cum s-a demonstrat, fierul are un rol esențial în metabolismul energetic al microorganismelor aerobe sau microaerofile. Or, pe măsură ce valorile de pH ale solului cresc peste 6,0, disponibilitatea $Fe^{3+}$ pentru plante și microorganisme este mult redusă. Microorganismele competiționează pentru $Fe^{3+}$ eliberînd siderofori, mici proteine cu afinitate mare de legare a $Fe^{3+}$ (Leong, 1986). Afinitatea sideroforilor pentru $Fe^{3+}$ variază foarte mult la diferitele microorganisme. Ea este de aproximativ 10 ori mai mare în cazul sideroforilor de la *Pseudomonas*, comparativ cu cei ai fungilor. Capacitatea microorganismelor de a competiționa pentru $Fe^{3+}$ depinde de diferențele în producția cantitativă a sideroforilor, de afinitatea acestora pentru $Fe^{3+}$ și de specificitatea propriilor siderofori pentru proteinele-receptor, din membrana externă a celulelor bacteriene.

Baker și colab. (1986) au demonstrat că aptitudinea microorganismelor de a coloniza rizosfera depinde în mare măsură de capacitatea lor de a utiliza diferite complexe siderofor —$Fe^{3+}$, pe lîngă cele proprii. În acest sens, Schippers (1987) a demonstrat că tulpina de *Pseudomonas putida* WCS 358 descrisă de el ca *stimulatoare* de creștere a plantelor („Plant growth promoting rhizobacteria") poate utiliza sideroforii multor tulpini de *Pseudomonas* fluorescente, izolate din rizosfera de cartof. În schimb, proprii săi siderofori nu pot fi utilizați decît de un număr foarte mic de alte microorganisme.

**Rolul sideroforilor în stimularea creșterii plantelor.** Leong (1986), precum și Schippers și colab. (1986, 1988) au demonstrat prin experiențe în seră că sideroforii unor tulpini fluorescente de *Pseudomonas* au un rol-cheie în stimularea creșterii multor plante, prin suprimarea unor microorganisme

care influențează negativ funcțiile rădăcinilor. Astfel, tratarea tuberculilor de cartof cu *Ps. putida* WCS 358 mărește producția cu 13%. Rezultatele au fost confirmate și în cîmp.

Schippers (1988) consideră că acest rezultat este determinat de interacțiunile dintre rizobacteriile care stimulează creșterea cu cele dăunătoare și cu celulele radiculare. El se bazează pe observația că bacteriile dăunătoare din rizosfera cartofului produc HCN. Ele reprezintă aproximativ 50% din numărul total al rizobacteriilor. Acidul cianhidric alterează metabolismul energetic al celulelor radiculare (5 μm HCN supresează citocrom oxidaza din rădăcini) și scade capacitatea acestora de a prelua nutrienții din sol. Producția de HCN de către bacteriile dăunătoare din sol depinde de cantitatea de $Fe^{3+}$ disponibil. Or, după cum s-a demonstrat experimental, în prezența rizobacteriei *(Ps. putida* WC 358), care stimulează creșterea plantelor, sau a sideroforului său purificat *(pseudobactina)*, sinteza HCN de către tulpinile bacteriene dăunătoare este complet stopată (fig. 244).

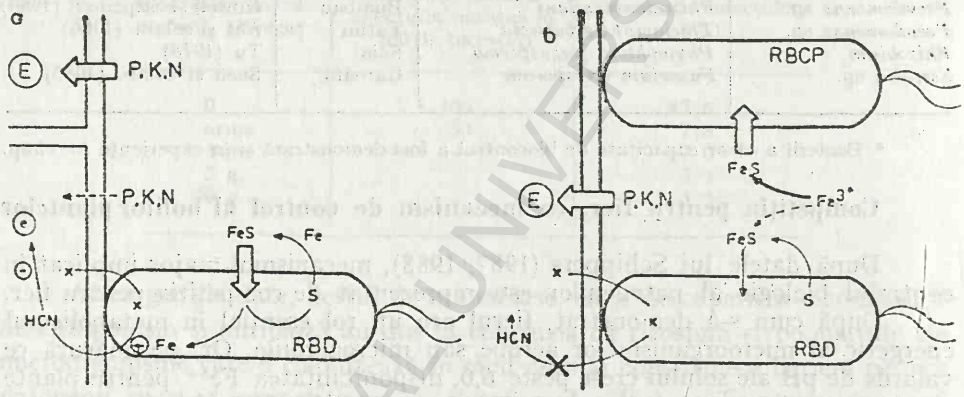



Fig. 244. — Reprezentarea schematică a interacțiunilor ipotetice dintre rizobacteriile care stimulează creșterea plantelor (RBCP), rizobacteriile dăunătoare (RBD) și celulele rădăcinilor plantei. **a.** Inhibarea funcției celulelor radiculare ale plantelor de cartof de către RBD care produc HCN. Preluarea fierului de către sideroforii (S) bacteriilor dăunătoare mărește producția de HCN de la componentul „X" al exsudatului radicular. HCN inhibă metabolismul energetic (e) al celulelor radiculare și astfel diminuă absorbția fosforului (P), potasiului (K) și azotului (N). **b.** Competiția pentru fier a sideroforilor rizobacteriilor stimulatoare (RBCP) inhibă producerea de KCN de către RBD și astfel mărește cantitatea de energie disponibilă (E) pentru absorbția de P, K și N de către celulele radiculare (după Schippers, 1988).

Descris ca valabil pentru plantele de cartof, fenomenul pare să aibă un caracter mult mai larg. Astfel, Baker și colab. (1986) au descris supresia spontană a vestejirii plantelor produsă de *Fusarium oxysporium formae speciales*, în anumite regiuni din California. Studiul detaliat a eliminat participarea altor mecanisme, teoretic posibile, și a ajuns la concluzia că suprimarea bolii este determinată de competiția pentru $Fe^{3+}$, mediată de sideroforii mai multor tulpini de *Ps. putida*. Ei acționează prin inhibarea germinării chlamidosporilor și a creșterii tubului germinativ în faza saprofită a fungilor în rizosferă.

În sfîrșit, Cook (1988) a adus probe suplimentare, în sensul evitării infecției cu *Gaeumannomyces graminis* sub influența unor tulpini de *Pseudomonas* fluorescente, care produc siderofori și un antibiotic de tip fenazinic.

Aceştia interferă cu agentul patogen în faza sa parazitară. Mutantele antibiotic-negative sînt mai puţin active.

Fenomenul are aplicaţii importante în combaterea biologică în cîmp.

## INTERACŢIUNILE MICROORGANISMELOR CU NEVERTEBRATELE DIN SOL

Rolul nevertebratelor în asigurarea structurii şi fertilităţii solului este cert. Artropodele şi rîmele mărunţesc litiera, o fragmentează în bucăţi mici, evidenţiind suprafeţe mari disponibile pentru a fi colonizate de microorganisme. În lipsa lor, elementele nutritive din sol ar fi înglobate într-o masă informă, compactă, de resturi vegetale şi animale, iar structura solului s-ar degrada în absenţa constituenţilor care asigură formarea şi stabilizarea ei.

Nevertebratele consumă cantităţi foarte mari de litieră vegetală. O singură specie, *Glomeris marginata*, ar putea consuma 10% din litiera totală de pe o anumită suprafaţă (MacFadyen, 1968). În intestinul lor, materia organică umectată este supusă acţiunii bacteriilor şi fungilor, în condiţii adecvate unor modificări chimice foarte mari. Ulterior, resturile degradate, amestecate cu mucilagiu şi probabil cu compuşi cu N (acid uric) şi cu P din excretele animalelor, sînt depuse în sol, unde sînt repede colonizate de diferite alte microorganisme.

Nevertebratele amestecă constant materialele din diferite straturi ale solului, creînd canale de aerare şi de drenaj ale apei şi favorizînd, în felul acesta, dezvoltarea microorganismelor aerobe. Datorită mobilităţii, asigură dispersarea microorganismelor şi colonizarea unor microhabitate noi, prin depunerea sporilor de pe suprafaţa lor sau din intestin de-a lungul traseului pe care îl străbat. În sfîrşit, diferiţii compuşi (în special cu N şi P), prezenţi în excretele animalelor sau în corpul lor după moarte reprezintă surse majore de nutrienţi pentru microorganisme.

## INTERACŢIUNEA MICROORGANISMELOR CU STRUCTURILE AERIENE ALE PLANTELOR

Frunzele, tulpinile, florile şi fructele plantelor sînt frecvent colonizate de microorganisme epifite (bacterii, fungi, în special levuri, alge) pentru care reprezintă habitate adecvate.

**Suprafaţa frunzelor** verzi sănătoase este populată de o serie de microorganisme saprofite, dintre care unele apar rar în alte nişe ecologice. Habitatul adiacent frunzei este numit *filosferă* (gr. „phyllon" = frunză) prin analogie cu termenul rizosferă, iar cel direct asociat cu frunza, *fitoplan*. Ele sînt populate de microorganisme diferite (Last, 1955; Ruinen, 1956). Mediul natural reprezentat de suprafaţa frunzelor este expus direct luminii solare, variaţiilor de climă şi de temperatură, de umiditate şi uscăciune, precum şi celor legate de vîrsta frunzelor. Dispersarea microorganismelor din filosferă este favorizată de ploi, de curenţii de aer, de praf, de insecte şi de unele mecanisme proprii (balistospori).

*Bacteriile* sînt cele mai numeroase şi includ, în special, ca şi în cazul celorlalte microorganisme, specii cu pigment roşu, verde-galben etc., cu rol protector faţă de radiaţiile solare.

Numărul lor, determinat în special la graminee și leguminoase și apreciat în medie la $10^5 - 10^7$ bacterii per g (greutate umedă), a fost găsit mult mai ridicat la trifoi și la *Secale cereale* ($10^7 - 10^9$ bacterii/g greutate umedă) (Stout, 1960).

Cel mai frecvent întîlnite sînt bacteriile din genurile *Corynebacterium, Enterobacter, Erwinia herbicola, Flavobacterium, Lactobacillus* și *Pseudomonas*. Se adaugă o serie de bacterii patogene care trăiesc temporar ca saprofite pe frunze și/sau muguri (Leben, Schrott și Hildebrand, 1970).

*Actinomicetele*, deși frecvente în sol, sînt prezente doar rar pe frunze.

*Microfungii*. Levurile sînt reprezentate, după Davenport (1976), de *Aureobasidium pullulans, Cryptococcus laurentii, Rhodotorula gracilis, Tilletiopsis* și *Torulopsis ingeniosus*. Cele mai frecvente sînt cele din genul *Sporobolomyces (S. roseus)*, care dispun de un mecanism foarte eficient de dispersare de la o frunză la alta, respectiv de balistospori.

Celelalte categorii de fungi aparțin grupelor: *Ascomycetes, Basidiomycetes* și *Fungi Imperfecti*. Ei pot fi saprofiți *(Ascochytula, Leptosphaeria, Phoma, Pleurospora)*, alohtoni proveniți din sol *(Cryptococcus, Myrothecium, Pilobolus* etc.) sau patogeni *(Alternaria, Epicoccum, Stemphylium* etc.).

*Algele* sînt, în general, din clasa *Chlorophyceae*.

Ruinen (1961) a descris o anumită succesiune în evoluția microbiotei din filosferă, în sensul colonizării inițiale de către bacterii. Ulterior, modificările induse de activitatea bacteriilor ar favoriza colonizarea levurilor și a fungilor filamentoși. Succesiunea ar reflecta modificările în compoziția nutrienților eliberați, iar în cazul fungilor filamentoși și pe cele legate de fenomene de senescență a gazdei (Last și Warren, 1972).

Microorganismele saprofite pot fi localizate și în filoplan.

La unele plante *(Secale cereale)* a fost descrisă o succesiune sezonieră a bacteriilor, greu de explicat în prezent, după schema: bacterii cromogene și *Xanthomonas* sp. (luna mai). *Xanthomonas* și *Pseudomonas* (iulie), *Xanthomonas* (septembrie), *Listeria* și *Staphylococcus* (octombrie) (Atlas și Bartha, 1987).

Un rol important pentru dezvoltarea microorganismelor din filosferă revine membranei cuticulare, care acoperă la exterior celulele epidermice. Ea este alcătuită din mai multe straturi distincte, cel mai extern, ceros, avînd un rol esențial în determinarea permeabilității (Martin și Junniper, 1970).

Îndepărtarea cerii (complex de compuși alifatici cu catenă lungă asociați la unele specii cu compuși ciclici ca acizii ursolic și oleanolic) are drept rezultat mărirea permeabilității. Ea crește la măr pentru vaporii de apă, de la 1,5 mg/cm²/zi la 107 mg/cm²/zi. Or, după cum s-a demonstrat, unele levuri *(C. laurentii, R. glutinis)* au acțiune lipolitică și acționînd asupra cerurilor cuticulare măresc permeabilitatea frunzei (dezavantaj pentru gazdă).

Dalbro (1955) apreciază pierderile de nutrienți prin frunze la 800 kg glucide, 20—30 kg K, 10,5 kg Ca, 9 kg Na, per hectar și per an. Turkey (1958) atribuie pierderilor continue prin permeabilitatea frunzelor o scădere în greutate de 6% în 24 de ore la plantele de fasole. Pierderile de nutrienți sînt mai mari la plantele cu deficit de nutrienți decît la cele cu nutriție adecvată, la frunzele lezate decît la cele normale și la întuneric mai mult decît la lumină. Frunzele bătrîne, cu o permeabilitate mărită datorită „erodă-

rii" suprafeței ceroase de către microorganismele saprofite, sînt mai permeabile decît cele tinere (fig. 245).

Pe lîngă nutrienții proveniți din planta-gazdă se adaugă cei din detritus, substanțele organice aduse de vînt și praf, precum și cele produse și eliberate de microorganisme (ioni anorganici, glucide, aminoacizi etc.) (Last și Warren, 972).

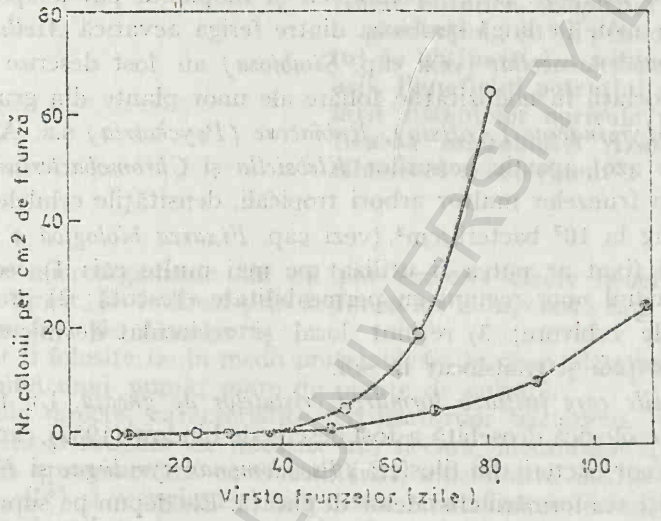



Fig. 245. — Efectele vîrstei frunzelor și ale anotimpului asupra numărului coloniilor de *Sporobolomyces* izolate de pe suprafața frunzelor grîului de toamnă: ● = frunze cu viață relativ lungă, dezvoltate în timpul iernii; o = frunze apărute recent, primăvara și vara (după Last și Warren, 1972).

*Semnificația microorganismelor din filosferă.* Numeroase exemple demonstrează că microorganismele saprofite pe suprafețele foliare pot controla eficient dezvoltarea patogenilor pentru plante. Acest efect se poate realiza, prin competiție în primele stadii de acțiune a acestora, prin sinteza de metaboliți care le diminuează virulența sau stimulează rezistența gazdei.

Crose (1965) a semnalat cazuri concrete în care microbiota saprofită a contracarat acțiunea unor patogeni ca *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas phaseolicola*, *P. morsprunorum* etc.

Unele microorganisme sintetizează fitoalexine, gibereline, substanțe de tip auxinic etc.

În sfîrșit, unii fungi endofiți ca *Acremonium coenophialum* produc substanțe repelente (dezagreabile sau toxice), care protejează planta-gazdă *(Festuca arundinacea)*, respingînd sau limitînd capacitatea de hrănire a afidelor sau producînd tulburări digestive animalelor erbivore. Fungii transmisibili prin semințe găsesc în planta-gazdă adăpost și nutrienți, iar aceasta beneficiază prin îndepărtarea consumatorilor potențiali.

Cunoașterea rolului microorganismelor din filosferă ridică o serie de probleme dificile legate de acțiunea fungicidelor. Acestea pot avea un efect benefic dacă omoară microfungii lipolitici *(Sporobolomyces, Aureobasidium)*, prin faptul că întîrzie fenomenele de senescență foliară, menținînd cerurile cuticulare în stare nealterată. Efectul poate fi însă nociv dacă diminuă rezistența naturală, prin îndepărtarea microorganismelor saprofite care competiționează cu cele patogene.

*Fixarea azotului.* Atît filosfera, cît și filoplanul pot adăposti bacterii fixatoare de azot. Pe lîngă simbioza dintre feriga acvatică *Azolla* cu cianobacteria *Anabaena azollae* (vezi cap. *Simbioza)* au fost descrise mai multe tipuri de asociații în nodozitățile foliare ale unor plante din grupurile *Dioscoriaceae, Myrsinaceae (Ardisia), Rubiaceae (Psychotria)* ș.a. Alte bacterii fixatoare de azot aparțin genurilor *Klebsiella* și *Chromobacterium.* În plus, pe suprafața frunzelor multor arbori tropicali, densitățile celulelor de *Beijerinckia* ajung la $10^7$ bacterii/cm$^2$ (vezi cap. *Fixarea biologică a* $N_2$*).*

Azotul fixat ar putea fi utilizat pe mai multe căi: 1) cedat plantei, prin intermediul unor regiuni cu permeabilitate crescută; 2) preluat direct de animalele erbivore; 3) reținut local și recirculat de microorganisme; 4) spălat de ploi și translocat în sol.

*Bacteriile care inițiază formarea cristalelor de gheață.* Un fenomen cu importanță ecologică deosebită a fost descris de Lindow (1982), care a demonstrat rolul unor bacterii din filosferă *(Pseudomonas syringae* și *Erwinia herbicola)* în inițierea formării cristalelor de gheață. Ele depun pe suprafața frunzelor o proteină („Ice-nucleation protein"), care servește ca „nucleu" în jurul căruia se depune cristalul de gheață.

Fenomenul, cu consecințe grave datorită leziunilor provocate de îngheț, prin lezarea și moartea frunzelor, a fost semnalat inițial în unele regiuni din S.U.A. unde afectează grav plantațiile de citrice. Pentru prevenirea lor s-a recomandat utilizarea unor mutante mutilate genetic („Ice-minus") la care au fost îndepărtate genele ce codifică proteina de nucleare. Ele diminuează mult daunele, asigurînd protecția plantelor la temperaturi de la — 7 pînă la — 9°C.

Răspîndirea lor în natură, în condiții riguros limitate și controlate, urmează să stabilească riscul potențial al modificării echilibrului microbiotei foliare normale.

**Florile** reprezintă habitate cu viață scurtă pentru o serie de microorganisme epifite între care: *Candida pulcherrima, C. renkanfii, Kloeckera, Rhodotorula, Torulopsis* etc. Ele folosesc concentratul de glucide din nectar. După fertilizarea florilor și în cursul coacerii fructelor mature, datorită modificărilor fizicochimice ale habitatului, populațiile de microorganisme suferă o succesiune în urma căreia devine dominantă populația de *Saccharomyces* (Atlas și Bartha, 1987).

# IMPLICAȚII PRACTICE ALE ACTIVITĂȚII MICROORGANISMELOR DIN SOL

**„Utilizarea deliberată a unor microorganisme din sol are o mare importanță economică pentru agricultura modernă. Ele pot înlocui fertilizatorii minerali costisitori și pesticidele chimice, asigurînd o creștere a producției, cu diminuarea costului de obținere și o reducere a poluării. Beneficiul potențial al manipulării sistemelor agricole prin modificarea microbiotei rizosferei și a filosferei este evident".**

Y. Okon
Y. Hadar

Diferite microorganisme din sol pot exercita efecte benefice asupra plantelor fie direct, fie indirect prin acțiunea lor antagonistă față de agenții patogeni sau față de dăunători.

Ele pot fi folosite fie în medii protejate, fie în cîmp, determinînd creșteri ale recoltei unui număr mare de plante de cultură.

Acțiunile directe, caracteristice fertilizatorilor bacterieni, stimulatorilor de creștere și fungilor de micorize au, fiecare, mecanisme specifice ca: suplimentarea aprovizionării cu N combinat, ameliorarea nutriției minerale ($NO_3^-$, $PO_3^{2+}$, $K^+$) și a regimului hidric sau solubilizarea fosfaților din sol și producerea de substanțe care stimulează creșterea plantelor.

Acțiunile indirecte se realizează prin reducerea pagubelor produse de agenții patogeni și de dăunători, în cazul insecticidelor bacteriene sau fungice, efecte erbicide sau nematocide, fenomene de antagonism sau antibioză, protecție față de îngheț etc.

Gama aplicațiilor importante este foarte largă. Extinderea utilizării lor este limitată, pe lîngă cunoștințele încă insuficiente, asupra unor probleme, de o serie de dificultăți specifice domeniului între care sînt de menționat: complexitatea și heterogenitatea solului ca mediu de viață, complexitatea relațiilor dintre microorganismele introduse de la exterior și cele autohtone, interrelațiile microorganismelor cu plantele (respectiv, după caz, cu suprafețele radiculare sau foliare etc.).

## Fertilizatorii bacterieni

Stabilirea rolului bacteriilor fixatoare de $N_2$ a impus ideea utilizării lor ca *fertilizatori bacterieni* („Bacterial fertilizers"), prin tratarea („bacterizarea") semințelor înainte de însămînțare sau a rădăcinilor plantelor cu culturi de microorganisme.

Insuccesele aplicării preparatelor conținînd culturi de *Azotobacter* sp. (ca, de exemplu, preparatul *Azotobacterin)*, în mare parte explicabile din punct de vedere științific, au diminuat interesul cercetătorilor pentru această preocupare. Ea este reluată în prezent într-un cadru mai larg și pe baze științifice remaniate fundamental (Brown, 1974; Okon și Hadar, 1987).

**Rhizobium.** Asociația simbiotică dintre bacteriile din genul *Rhizobium* și plantele leguminoase îmbogățește solul, în fiecare an, cu $90 \times 10^6$ tone metrice de N. Această cantitate este apreciată de unii cercetători ca fiind aproximativ dublă față de cea fixată prin procedeele industriale. După Okon și Hadar (1987), din cele 16—19 000 de specii de leguminoase existente (aparținînd la 750 de genuri), cel puțin cîteva sute pot beneficia de tratamentul cu tulpini selecționate de *Rhizobium*.

*Calitatea tulpinilor.* Una dintre dificultățile majore este cea de selecționare a unor tulpini adecvate, care trebuie să îndeplinească un set de condiții obligatorii ca:

1) infecțiozitate mare;

2) capacitate de a produce nodozități;

3) capacitate de a competiționa în sol cu alte tulpini de *Rhizobium* infecțioase, dar inactive ca fixatoare de $N_2$;

4) eficiență, respectiv capacitate de a fixa azotul printr-o interacțiune optimă cu planta-gazdă;

5) stabilitate genetică.

În prezent există o serie de criterii care, coroborate, pot da indicații asupra potențialului tulpinilor studiate prin:

1) infectarea plantelor axenice și asigurarea dezvoltării lor în condiții de sterilitate sau de gnotobioză;

2) determinarea numărului nodozităților;

3) stabilirea proporției nodozităților recente și a greutății lor uscate;

4) culoarea nodozităților (concentrația mare a leghemoglobinei (pigment roșu) este corelată cu infecțiozitatea);

5) distribuția nodozităților;

6) greutatea totală a plantei și separat a rădăcinilor, în stare umedă și uscată;

7) cantitatea de compuși cu N produși de plantă și procentul azotului în țesuturile vegetale etc.

Pentru considerente de ordin practic, tulpinile selecționate trebuie să crească abundent în condiții de laborator, pe medii de cultură artificiale, să supraviețuiască în mediul „purtător" înainte de administrare și să se dezvolte în sol după inoculare.

Somasegarau (1985) recomandă tratarea semințelor cu un inoculum avînd densitatea de $2{,}5 \times 10^9$ celule de *Rhizobium*/g.

Administrarea directă în sol este recomandabilă în cazul cultivării leguminoaselor în soluri calde, uscate, foarte acide, cînd condițiile climatice sînt adverse sau cînd semințele sînt tratate cu substanțe chimice toxice pentru bacterii (Okon și Hadar, 1987).

Între condițiile care pot afecta negativ bacterizarea sînt de menționat:

1) competiția cu tulpinile de *Rhizobium* din sol, infecțioase, dar ineficiente ca fixatori de $N_2$;

2) prezența unor secreții radiculare cu proprietăți inhibitoare (polifenoli, galotanin uri etc.);

3) intervenția unor microorganisme antagoniste (în special actinomicete), producătoare de substanțe inhibitoare sau antibiotice.

**Frankia.** Reducerea anuală a suprafețelor împădurite pe plan mondial cu 7,5—10 milioane de ha impune cu necesitate elaborarea unor programe de reîmpădurire necesară pentru satisfacerea necesităților societății pentru

lemn. Cum solurile cu calități superioare sînt rezervate pentru agricultură, reîmpăduririle urmează să valorifice pe cele cu fertilitate slabă (Browbaker, van den Belt și MacDicken, 1982).

Capacitatea actinomicetelor din genul *Frankia* de a forma nodozități radiculare *(actinorize)* la peste 23 de genuri de plante (care includ peste 200 de specii de plante dicotiledonate lemnoase poate fi, de asemenea, valorificată în practică. Asociația asigură, în funcție de specie și de regiunea geografică, o îmbogățire a solului cu 50—250 kg/ha/an.

Tehnica a fost utilizată cu succes pentru producerea de actinorize la peste 7 milioane de plante tinere (în special *Alnus* și *Eleagnus)*, în acțiunea de recuperare a unor terenuri în Quebecul de nord și în Montréal (Perinet și colab., 1985).

**Azospirillum.** Suspensiile dense de *Azospirillum* ($10^9$ bacterii/g de turbă) sau amestecul de bacterii/turbă în stare granulară au fost administrate cu succes de Okon, Kapulnik și Sarig (1986, 1987), cînd au fost utilizate în concentrații mari de (1—2 kg/ha și respectiv 4—6 kg/ha, în soluri fertilizate corect cu N, P și K.

În experimentele de cîmp, producția pe loturile tratate cu *Azospirillum* a fost cu 10—30% mai mare (inclusiv masa verde) la grîu, porumb și sorg, comparativ cu plantele netratate.

O estimare globală a aplicațiilor de pînă acum pe plan mondial relevă prezența rezultatelor bune în 65% din cazuri.

Insuccesele țin de proprietățile și densitatea bacteriilor din inoculum, de conținutul solului în substanțe organice, de natura și numărul total al microorganismelor din sol care competiționează pentru situsuri de legare pe suprafața rădăcinilor.

**Bacillus megaterium tulpina phosphaticum.** Fosforul este prezent în sol ca fosfați anorganici rezultați din eroziunea rocilor parentale și ca fosfat organic provenit din resturile plantelor, animalelor și microorganismelor din sol. Se apreciază că, în general, mai puțin de 5% este în forme disponibile pentru plante.

Experimental s-a demonstrat că unele bacterii *(B. megaterium „phosphaticum"* și *Pseudomonas fluorescens)* descompun fosfații organici acumulați în sol ca inozitol-fosfați (în special, ca mio-inozitol-fosfați) (Anderson, 1967). De asemenea, Sundara Rao și colab. (1963) au demonstrat capacitatea bacteriilor de a solubiliza fosfații din praful de oase, fosfatul de rocă, superfosfatul și hidroxiapatită.

Deși aceste rezultate sînt contestate ca fiind nedemonstrate fără ambiguitate (Martinez, 1968; Martin, 1973), numeroși cercetători au recomandat utilizarea suspensiilor de *B. megaterium* și *P. fluorescens* pentru creșterea cantității de fosfor disponibile pentru plante (Kudzin și colab., 1962; Menkina, 1963; Kavimandan și Gaur, 1971). Rezultatele acestor aplicații sînt cele mai contestate, deoarece nu au putut fi reproduse de mulți cercetători. Este probabil că efectele inoculării sînt pozitive numai în solurile deficitare în fosfat și în solurile care au primit fertilizatori organici și minerali în doze adecvate.

### Fungii de micorize veziculoarbusculare

Aceștia stimulează creșterea și producția plantelor cu care formează asociații simbiotice prin ameliorarea aportului de fosfat solubil, creșterea re-

zistenței la uscăciune, salinitate și la patogeni (Hayman, 1980, 1983; Menge, 1983). Se folosesc culturi de *Acaulospora* sp., *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus* și *Sclerocystis*. De acest tratament beneficiază numeroase plante de cultură (grîu, porumb, orz, cartofi, o gamă largă de legume), dar și unele plante furajere, pomi fructiferi etc.) Hayman, 1980; Maronek, 1981).

Aplicarea pe scară mare întîmpină unele dificultăți decurgînd din faptul că fungii micorizelor veziculoarbusculare nu se dezvoltă în absența rădăcinilor vii (Okon și Hadar, 1987). Singura modalitate de a produce cantități mari de inoculum este cea de infectare a rădăcinilor unor plante receptive ca iarba de Sudan *(Sorgum vulgare)*, cu ajutorul unor tehnici moderne (Mosse și Thompson, 1984), a plantelor de fasole *(Phaseolus vulgaris)* sau pe rădăcini de porumb.

**Fungii de ectomicorize** aparțin mai multor genuri și sînt comuni arborilor de pădure și ornamentali. Utilizarea lor are o importanță esențială în acțiunile de regenerare a pădurilor și mai ales pentru plantarea unor regiuni anterior neîmpădurite. Cei mai mulți fungi de micorize produc sporofori, care pot fi utilizați pentru inoculare. În unele cazuri se folosește ca inoculum solul de pădure.

Utilizarea culturilor miceliale pure de fungi selecționați pentru invadare are avantajul excluderii microorganismelor patogene și a altor contaminanți (Mark și Kenny, 1982).

Se folosesc, în general, fungi ca *Suillus plorans*, *Pisolithus tinctorius* ș.a.

**Fungii antagoniști.** Una dintre metodele de combatare biologică a microorganismelor fitopatogene se bazează pe utilizarea unor microorganisme din sol capabile să acționeze prin mecanisme ca antagonismul direct, competiție, protecție încrucișată etc.

Mai mulți fungi ca: *Penicillium*, *Gliocladium*, *Caetomium*, precum și unii membri ai genului *Trichoderma* sînt antagoniști fungilor fitopatogeni (Papavizas, 1985).

Mecanismul de acțiune este foarte diferit. Astfel, *Trichoderma harzianus* și *T. hamatus* sînt micoparaziți pe *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* și *Sclerotium rolfsii*, printr-un mecanism complex, care implică recunoașterea specifică mediată de lectine și dezvoltarea parazitului în direcția gazdei pe baza chemotropismului exercitat de aceasta. Cînd ajung în contact, antagonistul se încolăcește în jurul hifelor gazdei, după care produce enzime capabile să-i degradeze peretele celular (chitinaze și glucanaze), permițîndu-i să pătrundă intracelular (Elad și colab., 1983) și să determine liza hifelor (fig. 155).

Tulpinile antagoniste pot fi cultivate în laborator pe medii solidificate, pe semințe sau pe diferite substraturi solide organice, care servesc ca bază nutritivă și ca purtător pentru aplicare. Abd-el Moity, Papavizas și Shatla (1982) au obținut mutante de *Trichoderma* rezistente la pesticide, active și în prezența acestora.

Eficiența aplicării practice este limitată de faptul că *Trichoderma* nu atacă hifele tinere ale fungilor patogeni, ci numai pe cele senescente (Dubos 1984). *Laetisaria arvalis (Basidiomycetes)* împiedică atacul și îmbolnăvirea plantelor sensibile la *Pythium ultimum* și *Rhizoctonia solani*. Această acțiune se realizează prin sinteza unui compus, acidul 8-hidroxilinolenic (acidul laetisaric), care lizează un număr mare de fungi patogeni (Bowers și colab.,

1986). Structura chimică simplă a acestui antibiotic permite atît producerea lui pe bază de sinteză, cît și optimizarea structurală pentru a asigura o activitate maximă (Atlas și Bartha, 1987).

*Interferența hifală.* Deacon (1983) semnalează cazul speciei *Heterobasidion annosum* (anterior *Fomes annosus — Basidiomycetes)*, care produce pagube enorme în păduri (în special provocînd putregaiul pinilor). Ea colonizează cioturile arborilor tăiați, de unde sporii pot fi transmiși, pe cale aeriană, în sol și la rădăcinile arborilor sănătoși din vecinătate.

Ori de cîte ori regiunile respective sînt colonizate de altă specie, *Peniophora gigantea (Basidiomycetes)*, care este slab parazită, incapabilă să atace rădăcinile, aceasta exclude agentul patogen.

Fenomenul poate fi folosit pentru combaterea *H. annosum* prin „pensularea" buturugilor rămase de pe urma arborilor tăiați cu o suspensie groasă de spori de *P. gigantea*. Mecanismul acțiunii este de interferență hifală. În contact cu hifele de *P. gigantea*, *H. annosum* încetează să crească, prezintă alterări membranare și degenerează. Efectul este strict localizat la zona de contact. Mecanismul biochimic este necunoscut (Deacon, 1983; Atlas și Bartha, 1987).

### Combaterea biologică a bolii „Crown Gall"

Boala „Crown Gall" (cancerul bacterian al plantelor) este produs de bacteria *Agrobacterium tumefaciens* * capabilă să transfere în celulele vegetale o parte din propria sa informație genetică, determinînd proliferarea necontrolată a acestora și capacitatea de a sintetiza o serie de substanțe noi, *opinele*, utilizate de bacteria patogenă pentru creștere și multiplicare. Datorită acestor proprietăți *A. tumefaciens* este considerată ca o bacterie patogenă majoră prin pierderile provocate mai multor recolte.

Kerr (1980) a demonstrat că bolile de tip „crown gall" pot fi combătute prin preinocularea plantelor cu *Agrobacterium radiobacter* tulpina 84, care produce o bacteriocină** — *Agrocina 84* — cu un spectru foarte specific de gazde. Agrocina 84 este un compus cu greutate moleculară mică, cu o structură chimică asemănătoare adenin-nucleotidelor, care inhibă în mod specific creșterea tulpinilor de *A. tumefaciens*, ce poartă o plasmidă Ti de tip nopalinic.

Cele două specii de *Agrobacterium* competiționează și pentru situsurile de legare pe rădăcinile plantelor-gazdă.

Scufundarea rădăcinilor într-o suspensie de *A. radiobacter 84* cu densitatea de $10^7 — 10^9$ celule/ml, imediat înainte de plantare, asigură o protecție față de „Crown Gall" în 80—100% din cazuri.

### Bacterii care stimulează creșterea plantelor

Introducerea unor tulpini fluorescente de *Pseudomonas* cu proprietăți antagoniste a demonstrat capacitatea lor de a suprima activitatea microorganismelor dăunătoare din rizosferă (Schroth și Hancock, 1982).

Ulterior s-a demonstrat că aceste bacterii pot determina recolte substanțial crescute, fie direct, prin efecte de stimulare a plantelor (Kloepper,

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 441.
** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 440.

1987), fie indirect, prin protejarea rădăcinilor de acțiunea unor microorganisme potențial nocive prezente în solurile agricole (Baker și Scher, 1986).

Weller (1983) a demonstrat că prezența tulpinilor fluorescente de *Pseudomonas* pe rădăcinile plantelor de grîu sensibile la infecția cu fungii patogeni *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* împiedică apariția bolii. Ele au un efect similar de combatere a infecțiilor cu *Fusarium*, care produc vestejiri.

Efectul fiziologic al rizobacteriilor care stimulează creșterea plantelor (RSCP) este condiționat de colonizarea „agresivă" a sistemului radicular necesară pentru a asigura înlocuirea sau excluderea microorganismelor patogene sau potențial dăunătoare, al căror număr global în atmosferă este mult diminuat. Studiile în cîmp sînt limitate, deși datele preliminare demonstrează creșteri semnificative ale recoltelor după tratarea semințelor la sfecla de zahăr și la soia sau a tuberculilor la cartofi (Suslow, 1982; Okon și Hadar, 1987).

Unele date preliminare sugerează că efectele directe de stimulare a creșterii plantelor ar putea fi prezente la o gamă mai largă de bacterii inclusiv la *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp.

### Combaterea biologică a înghețului

Are la bază observația că efectul nociv al scăderilor de temperatură (de la —2 la —4°C) nu este determinat de temperatura scăzută *per se*, ci este consecința unor leziuni ale membranelor celulare determinate de producerea unor cristale de gheață. Experimental s-a demonstrat că formarea acestora este condiționată de depunerea pe suprafața frunzelor a unor proteine „de nucleare" („Ice-nucleating proteins"), în jurul cărora se formează cristalele de gheață (Lindow, 1983). Factorul de „nucleare" este o proteină legată de membranele celulare ale bacteriilor *Pseudomonas syringae* și *Erwinia herbicola*. Cele două bacterii epifite trăiesc comensal pe suprafața celor mai multe plante (*P. syringae* este normal patogenă numai pentru liliac, *Syringa vulgaris*). Ele sînt, deci, condiționat patogene, atunci cînd inițiază formarea cristalelor de gheață care produc leziuni foliare. În S.U.A. produc pagube enorme primăvara și toamna plantațiilor de citrice. După cum s-a demonstrat, reducerea activității celor două bacterii în cîmp este asociată cu diminuarea efectelor negative ale înghețului.

În vederea combaterii lor, Orser și colab. (1983), precum și Lindow (1985) au propus utilizarea unor mutante, prin deleție, inactive („Ice-minus"). Acestea sînt bacterii care seamănă din toate punctele de vedere cu tulpinile sălbatice (active) („Ice-plus"), dar din care au fost îndepărtate genele ce codifică proteina de îngheț. Ele intră în competiție cu tulpinile active, le domină numeric și împiedică formarea cristalelor de gheață, chiar la temperaturi de —7 pînă la —9°C. Studiile efectuate în laborator și în case de vegetație, pe plante de porumb, au demonstrat scăderea marcată a sensibilității la frig.

Teoretic, utilizarea ca antagoniști a tulpinilor modificate genetic de *P. syringae* și *E. herbicola* nu pare să prezinte riscuri pentru mediul înconjurător, iar protejarea recoltelor sensibile la frig cu ajutorul lor poate aduce beneficii economice substanțiale.

## Erbicidele microbiene

Ineficiența multor tehnologii convenționale de combatere a buruienilor cu ajutorul substanțelor chimice a atras atenția asupra posibilității de utilizare ca micoerbicide a unor fungi patogeni, cel puțin ca o metodă adițională de combatere biologică.

Sînt posibile două abordări, după Okon și Hadar (1987):

1) *„Tactica zisă clasică"* implică importul unui anumit patogen dintr-o regiune de coevoluție cu gazda sa și eliberarea lui într-o altă regiune, în care planta-gazdă a devenit o problemă, fiind greu de combătut.

Tehnica se bazează pe unele observații care au demonstrat că introducerea accidentală sau deliberată a unor patogeni a permis combaterea eficientă a unor buruieni rezistente la alte tratamente.

Utilizînd această tactică s-au obținut și rezultate contrare, de import al unor patogeni nedoriți, foarte dăunători.

2) *„Tactica bioerbicidării"* implică producția în masă a microorganismelor patogene și aplicarea lor ca erbicid.

Quimby și Walker (1982) au precizat calitățile unui erbicid microbian:

a) spectru limitat de gazde;
b) stabilitate genetică;
c) capacitate de multiplicare intensă în laborator;
d) patogenitate în condiții variabile de mediu.

Există în prezent numeroase exemple de utilizare cu succes a unor preparate comerciale. Templeton, TeBeest și Smith (1984) au combătut cu succes buruienile din orezării, utilizînd 200 de miliarde de spori de *Colletotrichum gloeosporoides* la hectar. Walker (1981) a folosit sporii de *Alternaria macrospora* ($1 \times 10^8$ conidii/gram) pentru combaterea gazdei sensibile *Anolla cristata*, care produce pagube foarte mari culturilor de bumbac, și *Alternaria cassia* pentru a combate pe *Cassia obtusifolia* în culturile de soia.

În funcție de planta-gazdă, un număr important de fungi au fost folosiți ca micoerbicide în ultimul deceniu. Între aceștia sînt de menționat: *Alternaria cuscutacidae, Cercospora eupatorii, Colletotrichum xanthii, Puccinia caniculata, Puccinia chondrillina, Phytophtora palmivora* ș.a.

Extinderea utilizării micoerbicidelor necesită cercetări prealabile privind spectrul de gazde, lipsa patogenității pentru plantele utile și aspectele toxicologice ale utilizării lor.

Utilizarea tehnicilor de inginerie genetică (fuziunea de protoplaști și tehnologia ADN recombinat) face posibilă obținerea unor tulpini cu eficiență maximă prin combinarea patogenității a două entități separate pentru a forma un micoerbicid mult mai eficient.

Integrarea erbicidelor microbiene cu metodele clasice de combatere a buruienilor este deosebit de promițătoare în mod deosebit pentru speciile rezistente la pesticide și pentru diminuarea poluării mediului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# HIDROECOSFERA

# STRUCTURA ȘI DINAMICA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME DIN APE

**„Este necesar să cunoaștem calitățile apelor . . .”**

HIPOCRATE

**„Sistemele acvatice sînt neobișnuite prin faptul că sînt mult mai rezistente la fluctuațiile extreme ale mediului decît sistemele terestre sau decît atmosfera.**
**Aceasta este datorită proprietăților unice ale apei”.**

M. FLETCHER

**„Marea este un laborator biochimic gigant, ca un chemostat, în care o mare diversitate de organisme acționează în asociere sau în competiție unele cu altele, pentru a utiliza concentrații mici și difuze de nutrienți”.**

C. ZOBELL

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# HIDROECOSFERA

# STRUCTURA ȘI DINAMICA POPULAȚIILOR DE MICROORGANISME DIN APE

**„O abordare globală, multilaterală, a problemelor de limnologie sau de oceanografie, fără a ține seama de Microbiologie, nu mai este posibilă ...".**

G. RHEINHEIMER

Importanța prezenței și activității microorganismelor în aproape toate tipurile de acumulări de apă, de la cele subterane la cele mici și temporare de suprafață și la cele enorme, cum sînt mările și oceanele, a devenit evidentă la foarte puțin timp după apariția Microbiologiei ca știință.

Numeroasele studii efectuate au permis apariția *Microbiologiei acvatice*, domeniu de studiu interesat de structura și viața comunităților de microorganisme prezente în izvoare, rîuri și fluvii, lacuri, bălți, mări și oceane. Ea include studiul interacțiunilor dintre microorganismele componente sau cu alte organisme (plante sau animale), rolul în fluxul de materie și energie al ecosistemelor respective și în circuitul biogeochimic al elementelor în apă și sedimente, precum și în comportamentul formelor terestre în mediile acvatice.

Microbiologia acvatică are strînse interdependențe nu numai cu domeniile de bază (Ecologia și Microbiologia generală), ci și cu Botanica, Zoologia, Hidrochimia, Geologia, Hidrologia etc.

## CARACTERIZARE GENERALĂ A MEDIILOR ACVATICE

**„Proprietățile apei și ale constituenților săi domină scena metabolismului".**

M. FLORKIN

Hidroecosfera este alcătuită din două compartimente distincte: apa mărilor și a oceanelor, care reprezintă ≈97,3% (după Jannasch, 1984), și apa de pe continente (2,7%).

*Mediul marin și oceanic* însumează o suprafață de 361 milioane km² și un volum de apă total de $1\,370 \times 10^{15}$ m³. În atmosferă se găsește numai o cantitate redusă de apă, estimată la $0{,}013 \times 10^{15}$ m³.

*Apa continentală*, însumînd $38{,}28 \times 10^{15}$ m³, este repartizată, după Peixoto și Kettani (1973), după cum urmează:

1) $29 \times 10^{15}$ m³ (1,8—2,1% din apa totală a hidrosferei) în ghețari și în ghețurile polare;

2) $8,4 \times 10^{15}$ m³ (0,3—0,8%), în acviferele subterane. Din această cantitate, apa prezentă în sol, respectiv în *vados* (apa care aparține scoarței terestre, deasupra nivelului de apă subterană permanentă), corespunde la $0,066 \times 10^{15}$ m³. Restul este apă freatică, aproximativ egal răspîndită între rezervoarele mai adînci de 800 m și cele superficiale situate deasupra acestui nivel;

3) apa din lacuri și rîuri însumează $0,2 \times 10^{15}$ m³, ceea ce corespunde la 0,009% și respectiv la 0,00009% din apa totală a hidrosferei.

4) în sfîrșit, apa conținută în organismele vii din biosferă reprezintă $0,0006 \times 10^{15}$ m³.

**Circulația apei în natură.** Apa este supusă unui proces continuu de circulație, avînd o componentă atmosferică, în care predomină faza gazoasă, și alta terestră, în care predomină fazele lichidă și solidă.

Sursa principală de apă din atmosferă este, în principal, evaporarea apei din mări și oceane, căreia i se adaugă cea provenită din lacuri, rîuri, zăpezi, ghețari, sol, rezervoare acvatice create de om. Ea este transportată, prin fluxul circulației generale, din atmosferă, atît în stare gazoasă (ca vapori de apă), cît și în stare condensată (nori) și revine pe pămînt sub formă de precipitații lichide sau solide (zăpadă, grindină). În cădere, acestea antrenează particulele pe care sînt atașate microorganismele din atmosferă. Apa astfel revenită din atmosferă se infiltrează prin scoarța terestră, pentru a forma pînzele de apă subterană, se scurge în rîuri și fluvii și cu acestea ajunge din nou în oceane, de unde prin evaporare revine în atmosferă.

Circulația apei implică un schimb continuu de energie între atmosferă și suprafața terestră. Exceptînd participarea unei cantități neglijabile de energie provenită din interiorul pămîntului, toată energia care dirijează circulația continuă a apei provine de la soare.

### Tipurile de medii acvatice

În funcție de natura habitatelor caracteristice, mediile acvatice naturale se împart în:

1) **Ape de suprafață** — care reprezintă medii adecvate pentru numeroase microorganisme — variate ca tip și ca număr, în funcție de proprietățile fizico-chimice ale apei și de condițiile geografice, climatologice și biologice. Sînt, de asemenea, susceptibile de contaminare din aer (prin precipitații), din sol, din ape reziduale etc. Ele sînt de două tipuri:

a) *ape dulci* sau *limnetice*, care, la rîndul lor, sînt de două tipuri:

— *ape lentice* (stagnante), de tipul lacurilor, bălților, mlaștinilor etc. sau care se deplasează lent;

— *ape lotice* (curgătoare), de tipul izvoarelor, rîurilor și fluviilor;

b) *ape marine și oceanice.*

2) **Ape subterane** (engl. „Ground water"), *freatice* sau *acvifere.*

În funcție de concentrația lor în săruri, apele naturale pot fi clasificate ca: 1) *ape dulci* (0—1 g/l); 2) *ape salmastre* (1 — 25 g/l); 3) *ape sărate* (25—50 g/l); 4) *ape foarte sărate* (>50 g/l) (Trufaș și Trufaș, 1975).

## PREZENȚA MICROORGANISMELOR ÎN APELE NATURALE

Relativ puțin studiată, datorită, în mare măsură, dificultăților tehnice, are particularități variabile în funcție de natura apelor respective (curgă-

toare sau stătătoare, dulci sau marine). În apele deschise, la distanță de sol sau de sedimente, precum și în lipsa altor organisme, densitatea microorganismelor atinge rar limita minimă ($10^6$/ml; $10^6$/g) considerată ca semnificativă pentru o contribuție eficientă în ecosistem. Cele mai multe bacterii nu trăiesc libere în apele naturale, ci legate de plancton, de diferite detritusuri sau agregate. Cele prezente în stare liberă în apele dulci sînt rar autohtone și cel mai adesea în tranzit dintr-o localizare în alta. Deși foarte multe bacterii din ape sînt mobile, deplasarea activă este puțin semnificativă, deoarece se realizează numai pe distanțe foarte mici.

Sub raportul dispersării microorganismelor există o deosebire fundamentală între apele dulci și marine.

În *apele marine*, microorganismele sînt răspîndite pe suprafețe mari prin deplasarea laterală a curenților orizontali, prin mișcările curenților verticali și de „upwelling", prin amestecul apelor de suprafață produs de vînt. Valurile și curenții marini poartă microorganismele la distanțe mari de localizarea lor inițială, proiectîndu-le și în aer. În același timp, curenții verticali și de „upwelling" contracarează parțial tendința de sedimentare gravitațională. Oceanele sînt în foarte mare măsură interconectate, formînd un mediu unic, în care bacteriile pot fi purtate dintr-o regiune în alta fără o intervenție semnificativă a microorganismelor din sol sau din aer.

*Apele dulci* sînt mai puțin interconectate și, ca urmare, microorganismele respective au mai multe caracteristici în comun cu cele terestre decît cu cele marine.

*Apele curgătoare* repezi, în special viiturile, transportă frecvent microorganisme din sol la distanțe mari. Ajunse în ultimă instanță în mări, microorganismele din apele dulci nu supraviețuiesc datorită condițiilor nefavorabile (salinitate, temperatură, presiune, diluție etc.).

*Apele freatice* sînt deposedate de cele mai multe microorganisme pe măsură ce apa percolează prin straturile superioare ale solului. Exceptînd cazurile de poluare accidentală, ele au doar o mică încărcătură microbiană comparativ cu cele de la suprafața solului.

## FACTORII FIZICI ȘI CHIMICI CARE INFLUENȚEAZĂ NATURA ȘI ACTIVITATEA MICROORGANISMELOR DIN MEDIILE ACVATICE

Numeroase studii efectuate asupra diferitelor tipuri de bazine acvatice au evidențiat influența majoră a unor factori fizici sau chimici asupra microorganismelor prezente și activității lor. Între cei mai importanți sînt următorii:

### Lumina

Reprezintă un factor esențial pentru asigurarea vieții în ecosistemele acvatice, deoarece inițiază fluxul de energie, prin conversia energiei radiante solare în energie chimică, asigurînd dezvoltarea producătorilor primari, care stau la baza lanțului trofic.

Cantitatea de lumină utilizabilă în fotosinteză prezintă variații diurne și sezoniere și este influențată de turbiditate, de turbulența de la suprafața apelor, de unghiul de incidență a radiațiilor, de efectele de dispersie exercitate de materia particulată sau de prezența organismelor. Datorită acestor fac-

tori, chiar în condițiile cele mai favorabile, numai un mic procent din energia radiantă incidentă este convertită în energie chimică de producătorii primari.

În funcție de gradul de turbiditate, lumina poate fi utilă pentru fotosinteză numai pe o adîncime de cîțiva metri, în timp ce în largul oceanelor, zona fotică se poate extinde între 0 și 200 m (Rheinheimer, 1985). După Campbell (1977), la adîncimea de 3—4 m pătrunde doar 50% din lumina incidentă, iar la 50 m doar 10%. În plus, odată cu adîncimea, datorită funcției de absorbție a apei, se schimbă și natura radiațiilor: cele cu lungime de undă scurtă (albastru) se transmit cel mai mult, iar cele roșii cel mai puțin (fig. 246).

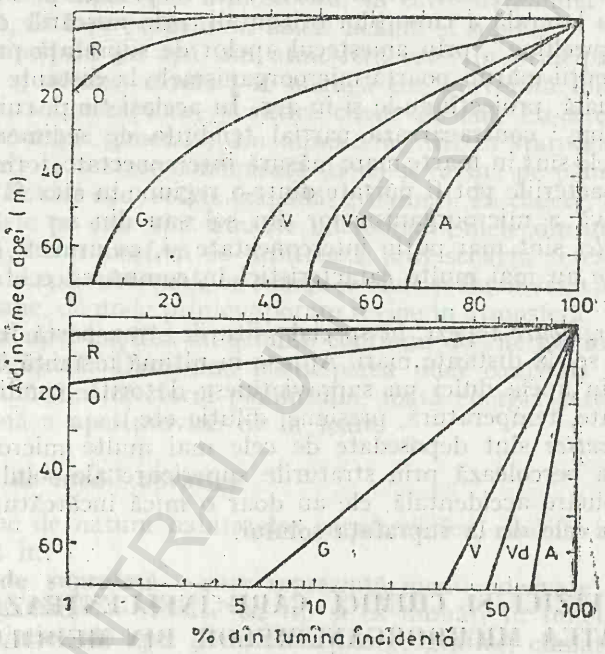



Fig. 246. — Pătrunderea luminii cu diferite lungimi de undă (λ) într-o coloană de apă, evidențiind faptul că lumina vizibilă albastră (A), cu lungimea de undă cea mai scurtă, pătrunde la adîncimi mai mari decît cea roșie (R) cu lungime de undă mare: O = oranj; V = violet; Vd = verde. Graficul superior prezintă o reprezentare la scară aritmetică, iar cel inferior la scară semilogaritmică (după Wetzel, 1975).

Zonele mai puțin iluminate, improprii pentru dezvoltarea algelor, sînt populate de bacteriile fototrofe anaerobe, *Rhodospirillales* (purpurii) și *Chlorobiales* (verzi). Ele fac fotosinteză anoxigenică, utilizînd $H_2S$ și diferiți compuși organici, ca donatori de H, folosind cantități foarte mici de lumină (50 lucși pentru bacteriile purpurii și numai 5 lucși pentru cele verzi) (Rheinheimer, 1985).

Microorganismele fototrofe mobile își pot regla poziția în coloana de apă datorită fenomenelor de fototaxie, în funcție de intensitatea luminii.

Un comportament similar au protozoarele „verzi" care adăpostesc endosimbionți fotosintetizanți.

Lumina exercită și alte efecte asupra biologiei microorganismelor. Astfel, diatomeea *Nitzschia* se divide, în special, la lumină, în timp ce dinoflagelatele *(Ceratium* sp.) la întuneric.

*Efecte negative.* Lumina intensă poate produce efecte inhibitoare sau chiar distructive (prin fotooxidare) asupra microorganismelor din straturile superficiale ale apelor, în special asupra celor din neuston. Aceste efecte ar putea explica numărul relativ redus de bacterii de la suprafața apelor oceanice clare.

Sînt exceptate microorganismele care conțin pigmenți carotenoizi cu rol protector față de radiațiile dăunătoare, mai rezistente *in vitro* la acțiunea radiațiilor UV sau luminoase (în special, verzi și albastre) decît speciile nepigmentate. Lumina albastră ($\lambda = 366-436$ nm) inhibă oxidarea nitritului la nitrat de către *Nitrobacter winogradskii*, probabil prin distrugerea citocromilor (Rheinheimer, 1985).

Acțiunea antimicrobiană a radiațiilor solare (în special UV) explică, alături de alți factori (diluție, competiție etc.), acțiunea de autoepurare a apelor contaminate accidental.

### Temperatura

Considerată de cei mai mulți cercetători ca unul dintre factorii ecologici cei mai importanți pentru dezvoltarea microorganismelor marine, temperatura este, alături de oligotrofie, răspunzătoare de încetinirea activităților metabolice.

În regiunile de suprafață, temperatura apei mării variază în funcție de condițiile climatice, putînd ajunge la 28°C la tropice (ZoBell, 1963) sau apropiindu-se de punctul de îngheț în regiunile polare*. În regiunile temperate și subtropicale, temperatura suferă variații sezoniere și chiar diurne. La adîncimi sub 50 m, este mai mică de 10°C, iar sub termoclină, este relativ constant sub 5°C (cel mai adesea 3°C) (Jannasch și Taylor, 1984). Aceasta demonstrează că peste 90% din volumul mediului marin este mai rece de 5°C. Pornind de la această constatare , Brunn (1959) a propus o zonare ecologică bazată pe temperatură, în care termenul de psihrosferă este aplicat regiunilor cu temperaturi mai mici de 10°C, spre deosebire de regiunile mai calde, care formează *termosfera.* Cu toate acestea, mediul marin nu este considerat un mediu extrem, deoarece temperatura nu atinge punctul de îngheț al apei. Fac excepție regiunile vulcanice submarine de tipul riftului Galapagos, în care se găsesc frecvent izvoare termale cu temperaturi de 300—400°C.

Mediul marin este populat de microorganisme psihrofile. Ele cresc lent pe medii nutritive la 0—5°C, dar virtual, toate, pot să se dezvolte mai repede la 20—25°C (Morita, 1976). Cele mai multe sînt termosensibile și stenoterme și nu se pot dezvolta la temperaturi mai ridicate. După ZoBell (1963), numai 7—18% din bacteriile izolate din tranșeele abisale din Filipine supraviețuiesc 10 minute la 40°C, 20—30% nesupraviețuind nici 10 minute la 30°C.

* Datorită concentrației mari în săruri, punctul de îngheț al apei de mare este la — 1,86°C.

## Presiunea hidrostatică

Este unul dintre factorii majori care afectează natura microorganismelor și procesele biologice din mediul marin. Ea crește linear cu adîncimea, respectiv cu 1 atm (1 atm = 101,325 KPa) la fiecare 10 m. Deviația de la această valoare este de +9,4 atm la 5000 m și de +29 atm la 10 000 m pentru latitudinea de 30°, în principal, datorită compresibilității apei de mare și modificărilor gravitaționale. În consecință, jumătate din suprafața planetei este acoperită cu apă supusă unei presiuni de 380—1100 atmosfere.

Presiunea hidrostatică mărită are un efect complex atît asupra proprietăților fizico-chimice ale apei, modificîndu-i gradul de ionizare, de pH și vîscozitatea, cît și asupra microorganismelor. Ea influențează solubilitatea și viteza de transport ale nutrienților prin membranele celulare, cinetica enzimatică, volumul molecular, structurile terțiară și cuaternară ale proteinelor și morfologia bacteriilor. De asemenea, presiunea mărită întîrzie creșterea microorganismelor alohtone și determină, după cîteva zile, pierderea viabilității lor, în așa fel încît nu se mai pot dezvolta sub 200 m.

După Jannasch (1984), barotoleranța bacteriilor variază în limite foarte mari. Unele tulpini încetează să se dezvolte la 200 atm, în timp ce în cazul celor barotolerante extreme limita la care presiunea mărită este nocivă nu este cunoscută. Yayanos, Dietz și Van Boxtel (1981) au izolat din tranșea Mariana, de la 10 500 m, dintr-un amfipod colectat cu ajutorul unei sonde colectoare, o bacterie barofilă, care nu crește la presiuni mai mici de 350 atm. Ea prezintă o dezvoltare optimă la 690 atm (timpul de generație este de 25 de ore) și continuă încă să crească bine la 1000 atm (TG=33 de ore).

Figura 247 prezintă curbele de creștere în funcție de presiunea hidrostatică a bacteriilor barotolerante, barofile și obligat barofile.

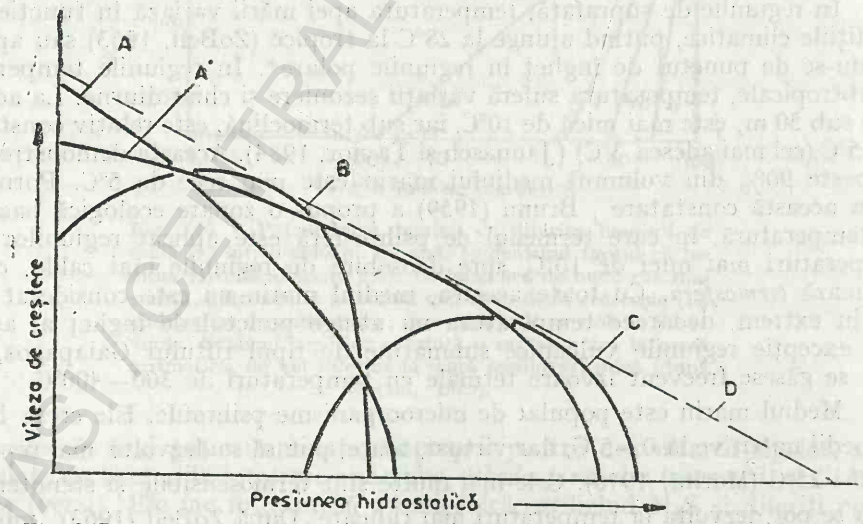



Fig. 247. — Reprezentarea schematică a influenței presiunii hidrostatice asupra creșterii microorganismelor: A și A' = barotoleranță în grade diferite; B și C = barofilie; C = barofilie obligată cu incapacitate de a crește la 1 atm; D = declinul general al activităților metabolice pe măsura creșterii presiunii. Relațiile cantitative între răspunsurile A — D, ca și formele curbelor sînt arbitrare, deoarece reprezentarea grafică a fost făcută pe baza datelor disponibile obținute în condiții nu totdeauna comparabile (după Jannasch și Taylor, 1984).

Barofilia este frecvent asociată cu copiotrofia. Microorganismele barofile sînt abundente în habitatele bogate în nutrienți ca, de exemplu, în conținutul intestinal al animalelor marine, în carcasele în curs de descompunere etc., unde au un avantaj competitiv față de cele din mediul acvatic oligotrof. Fenomenul este avantajos din punct de vedere ecologic pentru că mărește viteza de degradare microbiană a substanțelor organice în adîncul mării. În același timp, acest proces determină eliberarea unor intermediari de degradare solubili, a căror conversie pînă la mineralizarea completă este asigurată de microorganismele oligotrofe.

Există încă puține informații privind specificitatea, modul și gradul de adaptare ale microorganismelor autohtone la presiuni ridicate.

Morita (1976) a semnalat faptul că microorganismele pot tolera mai ușor presiunile mari la temperaturi subminimale decît la cele superioare limitelor lor de creștere. Este probabil că în limitele temperaturilor de creștere, activitatea enzimatică, sintezele macromoleculare și mecanismele de transport sînt sensibile la presiunile mari, în timp ce la temperaturi subminimale acestea sînt rezistente.

Yayanos și Dietz (1982) au confirmat acest punct de vedere, admițînd că adaptarea microorganismelor la presiunile mari din adîncul mării, sub forma unei barofilii combinate cu psihrofilia are un caracter universal și reprezintă un factor de control al vitezei activităților microbiene globale.

Jannasch și Taylor (1984) au confirmat existența acestei corelații doar parțial, deoarece barotoleranța foarte marcată a fost întîlnită și în cazul unor microorganisme izolate de la suprafața mării și chiar din solul de grădină.

### Turbiditatea

Un factor care afectează semnificativ viața microorganismelor este turbiditatea determinată de *seston* (L. „sessio" = ședere, a se depune, a se așeza), respectiv de totalitatea materiei particulate aflată în suspensie în apă și care, în ultimă instanță, determină formarea sedimentelor.

Sestonul este alcătuit din doi componenți majori:

1) *Biosestonul* reprezentat de bacteriile liber înotătoare, fitoplancton și zooplancton;

2) *Abiosestonul* sau *triptonul* (engl. „to trip" = a pluti în apă) corespunzător materiei particulate neanimate. El se poate prezenta sub două forme:

a) ca particule fine de materiale provenite din sol, desprinse prin acțiunea de erodare și/sau solubilizare exercitată de apă asupra țărmului;

b) ca particule de detritus, respectiv de materiale organice, derivate, în mare parte, din țesuturi „recalcitrante" la degradare (conținînd lignină, celuloză, hemiceluloză, chitină etc.).

Cantitatea de seston este mică în bazinele acvatice oligotrofe, cum sînt rîurile și lacurile curate sau în largul oceanului. Ea poate fi apreciată direct, gravimetric, sau indirect, măsurînd gradul de transparență al coloanei de apă (Rheinheimer, 1985).

Turbiditatea este importantă, în primul rînd, pentru că determină adîncimea la care radiațiile solare pot asigura procesul de fotosinteză și realizarea productivității primare. În al doilea rînd, detritusul și, în general, particulele aflate în suspensie reprezintă substraturi de care microorganis-

mele pot adera sau pe care le pot metaboliza. Cele mai multe particule de detritus sînt colonizate de microorganisme detritivore, care găsesc astfel condiții mai bune de hrană decît în coloana de apă, mai ales în mediile oligotrofe. În unele ape bogate în seston există un paralelism între gradul de turbiditate și numărul bacteriilor saprofite (fig. 248) (Rheinheimer, 1985), iar numărul bacteriilor aderente de seston poate ajunge la 50—94% (Cammens și Walker, 1982).

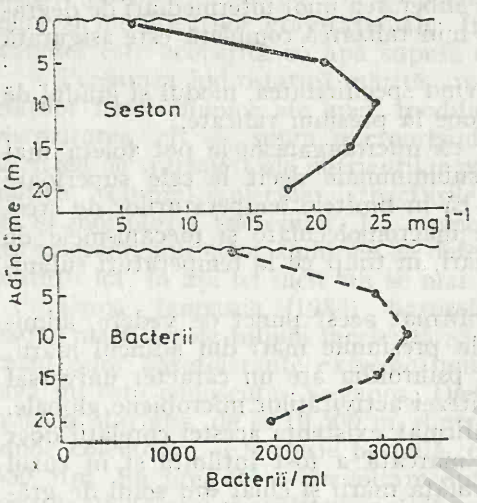



Fig. 248. — Reprezentarea schematică a distribuției verticale a sestonului și a corelației cu numărul bacteriilor saprofite în apa de mare (după Rheinheimer, 1985).

### Curenții

În funcție de prezența sau de absența curenților, mediile acvatice sînt împărțite în curgătoare (izvoare, rîuri, fluvii) sau stătătoare (stagnante), cum sînt lacurile, bălțile, mările și oceanele. În realitate, apele „stătătoare" sînt expuse unor curenți cu direcții diferite (verticale, orizontale, ascendente sau descendente), care mobilizează masele de apă, determinînd importante efecte ecologice. În cazul bazinelor mai mari se adaugă efectul vîntului și al valurilor.

În geneza curenților sînt implicate o serie de cauze diferite ca gravitația, în cazul apelor curgătoare, asigurînd curgerea „la vale", încălzirea inegală a maselor de apă, diferența de nivel etc. Curenții de adîncime se pot deplasa în sens invers celor de la suprafață și sînt, de regulă, mai lenți.

**Curenții oceanici** au o deosebită importanță deoarece determină modificarea uneia dintre cele mai importante proprietăți ale ecosferei marine și anume relativa uniformitate a condițiilor de mediu. Realizînd, în funcție de direcția lor (verticală sau orizontală) și de nivelul la care apar (suprafață sau în regiunile profunde), amestecul unor mase importante de apă, ei produc, în același timp, amestecul nutrienților și o redistribuire a microbiotei.

Cauzele determinante sînt diferite. Curenții termohalini sînt rezultatul încălzirii inegale a maselor de apă legată de variațiile de temperatură și de salinitate, care creează diferențe de densitate între masele de apă din adînc și cele de la suprafață. În alte cazuri intervin acțiunea combinată a forțelor rezultate din mișcarea de rotație a Pămîntului, vîntul etc.

Orientarea curenților oceanici este modelată de forma țărmurilor continentale, ca și de relieful fundului oceanic, fapt care a permis elaborarea unor hărți regionale sau globale ale curenților de suprafață sau de profunzime.

**Mareea** (engl. „Tide") este o formă de oscilație regulată și ritmică a nivelului Oceanului Planetar materializată prin creșterea nivelului *(flux* sau *maree înaltă)* și scăderea *(reflux* sau *maree joasă)*, în fiecare zi, în același loc. Evoluînd, în general, cu o periodicitate de 12 1/2 ore, mareea este de-

terminată de atracția Lunii și a Soarelui, ale căror acțiuni se combină în mod variabil în cursul unei zile.

Curenții de „upwelling" (engl. „up" = în sus; „well" = fîntînă, izvor) determină un amestec al apelor oceanice provocat de circulația apelor de la o adîncime mare la una mai mică, spre suprafață, sub influența unei divergențe a curenților din largul oceanelor sau a vîntului. Au o importanță biologică deosebită, deoarece vehiculează cantități importante de nutrienți (resturi de animale moarte acumulate ca atare, în suspensie sau în soluție, spre suprafață), mărind fertilitatea regiunilor de masă oceanică de suprafață. Existența curenților de „upwelling" explică marea productivitate a unor regiuni de coastă din Peru și California. Fenomenul de „upwelling" este adesea produs de-a lungul platformei continentale. În aceste cazuri, el este realizat de curenții de suprafață, respectiv de vîntul puternic care acționînd de la țărm spre larg, dislocă mase importante de apă de suprafață, care sînt înlocuite de cele din adînc prin „upwelling" (fig. 249) (Atlas și Bartha, 1987).

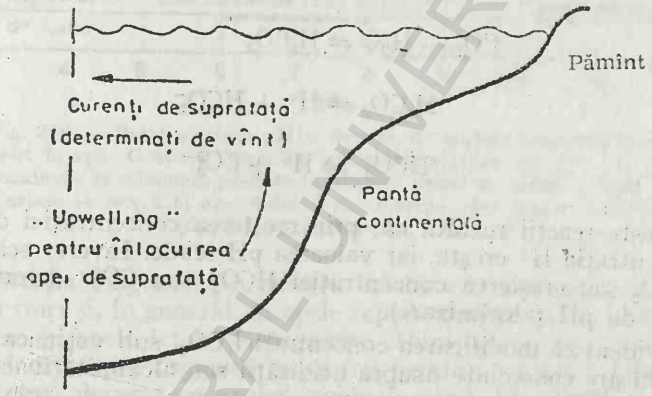



Fig. 249. — Formarea curenților de „upwelling" care determină circulația apei din profunzime de-a lungul pantei continentale pentru a înlocui apele de suprafață mobilizate de la țărm de vînt (după Atlas și Bartha, 1987).

Efectele curenților sînt complexe. În afara transportului de nutrienți, ei asigură o omogenizare a acestora, împiedicînd formarea zonelor de hiperoligotrofie pentru microorganismele sedentare. Acest fenomen ar putea explica consumul mai mare de nutrienți din apele curgătoare decît în cele stătătoare (Campbell, 1977). De asemenea, determină pătrunderea oxigenului spre straturile profunde ale bazinelor acvatice, după caz, dispersarea benefică a unor microorganisme sau îndepărtarea acestora dintr-un habitat adecvat cu efecte negative.

### Gazele dizolvate și valoarea pH

Bazinele acvatice naturale conțin cantități mici de gaze dizolvate, în particular, $CO_2$, $O_2$, $N_2$ și, în anumite condiții speciale, hidrogen, CO, $H_2S$ etc. Unele dintre ele, în special, $CO_2$ și $O_2$, în anumite condiții speciale au o importanță deosebită prin influența pe care o pot avea asupra naturii, numărului și activității microorganismelor acvatice.

**Bioxidul de carbon** provine din atmosferă și din respirația organismelor acvatice. Este necesar pentru fotosinteză, pentru activitatea microorganismelor chemoautotrofe și, în cantități mici, pentru bacteriile heterotrofe și fungi.

Concentrația $CO_2$ în lacuri, ca și în alte tipuri de bazine acvatice este mică la suprafață și supusă la fluctuații determinate de contactul cu atmosfera și de consumul prin fotosinteză. În straturile inferioare, crește cu adîncimea datorită stratificării. Variațiile concentrației $CO_2$ sînt importante, între altele, datorită corelațiilor lor cu valorile de pH ale apelor naturale, care sînt determinate de natura substanțelor dizolvate, capabile să producă, prin disociere, $H^+$*. În cazul apelor naturale, valorile de pH pot fi influențate de concentrația și natura sursei de carbon anorganic din mediu, care poate fi prezent ca $CO_2$ liber, $H_2CO_3$ (acid carbonic), bicarbonat $HCO_3^-$ și carbonat $CO_3^{2-}$. Aceste forme sînt rezultatul reacțiilor posibile ale $CO_2$ în mediul acvatic:

$$CO_2 + OH^- \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

$$HCO_3^- \rightleftharpoons H^+ + CO_3^{2-}$$

Din aceste reacții rezultă că, prin creșterea concentrației de $CO_2$ sau $H_2CO_3$, concentrația $H^+$ crește, iar valoarea pH scade. Invers, scăderea concentrației $CO_2$ sau creșterea concentrației $HCO_3^-$ sau $CO_3^{2-}$ determină creșterea valorii de pH (alcalinizare).

Este evident că modificarea concentrației $CO_2$ sub acțiunea unor condiții de mediu are consecințe asupra acidității sau alcalinității acestuia.

Practic, în condiții naturale, utilizarea sau îndepărtarea $CO_2$ prin fotosinteză crește valoarea pH, în timp ce adăugarea lui îl scade.

În mediile acvatice acide, care conțin $CO_2$ în exces, datorită unor condiții locale (diminuarea fotosintezei, intensificarea respirației etc.), apa acidă solubilizează carbonatul de calciu din rocile calcaroase, pentru a produce bicarbonat de Ca:

$$CaCO_3 + CO_2 + H_2O \rightarrow Ca(HCO_3)_2$$

Cînd concentrația $CO_2$ dizolvat scade (prin intensificarea consumului prin fotosinteză), are loc reacția inversă, de disociere a bicarbonatului de Ca și precipitarea carbonatului:

$$Ca(HCO_3)_2 \rightarrow CaCO_3 + CO_2 + H_2O$$

În concluzie, se poate afirma că creșterea concentrației $CO_2$ liber sau a $H_2CO_3$ mărește concentrația $H^+$, determinînd scăderea pH. Procesul in-

* Apa pură nu conține $H^+$, respectiv „nu are pH". Ea se disociază slab la ioni de hidroxoniu $H_3O^+$ și hidroxil $OH^-$.

vers, de scădere a concentrației $CO_2$ și $H_2CO_3$ sau de creștere a $HCO_3^-$ sau $CO_3^{2-}$ va crește valoarea pH (fig. 250).

**Oxigenul** provine în mediile acvatice din atmosferă sau este produs prin fotosinteza oxigenică a algelor și a cianobacteriilor.

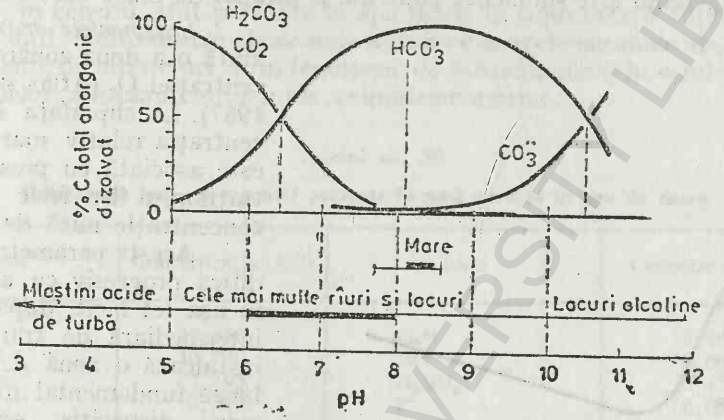



Fig. 250. — Relația dintre pH și tipurile de carbon anorganic prezent în apă. Graficul prezintă spectrul valorilor de pH, ca și maximele și minimele posibile în diferite tipuri de medii acvatice. Curbele se referă la ape dulci (cele marine sînt puțin diferite) (după Riley și Skirrow, 1965).

Concentrația oxigenului în diferite medii acvatice este variabilă. Este mai mare în râuri și, în general, în apele repede curgătoare și scade, în raport cu adîncimea, în apele lente și stagnante. Diminuarea este foarte evidentă în apele cu încărcătură organică mare (cu țesuturi vegetale în curs de descompunere, după deversarea apelor reziduale etc.). De asemenea, scade net în apele cu o termoclină marcată, care acționează ca o barieră pentru difuzia $O_2$ din straturile superioare, determinînd, uneori, trecerea bruscă spre un hipolimnion anoxigenic, în care predomină bacteriile facultativ anaerobe și mai ales obligat anaerobe.

În general, în lacurile mai adînci, ca și în mări concentrația $O_2$ este corelată invers cu cea a $CO_2$ (Campbell, 1977). Datele privind concentrația oxigenului în mări sînt adesea neconcordante.

Deși expuse frecvent la variații diurne și sezoniere, apele de suprafață prezintă un grad ridicat de oxigenare datorită contactului direct cu atmosfera, valurilor și curenților, precum și difuziei oxigenului produs prin fotosinteză (în zona eufotică, algele produc mai mult oxigen decît consumă). Concentrația scade progresiv sub zona eufotică, atingînd un prag minim la ~ 1000 m, unde absenței fotosintezei i se adaugă consumul de $O_2$ sub acțiunea numeroaselor bacterii. Ulterior, consumul de $O_2$ scade în continuare datorită numărului redus de microorganisme determinat de oligotrofie și concentrația lui crește din nou (fig. 251).

După Jannasch și Taylor (1984), cu excepția cîtorva bazine relativ „închise" (ca Marea Neagră, tranșeea Cariaco din Venezuela și diferite fiorduri din Norvegia și Canada), apele din adîncul mării, ca și straturile superioare

ale celor mai multe sedimente sînt oxigenate. Concentrația oxigenului dizolvat scade rar sub jumătate din nivelul de saturație al aerului (aproximativ 4 mg/l sau 130 μM). Această situație este determinată de consumul redus de $O_2$ propriu mediului oligotrof, rece și hiperbaric.

După Morita (1976), la adîncimea de 10 000 m, în unele locuri, concentrația oxigenului este suficientă pentru a fi utilizat de unele bacterii aerobe.

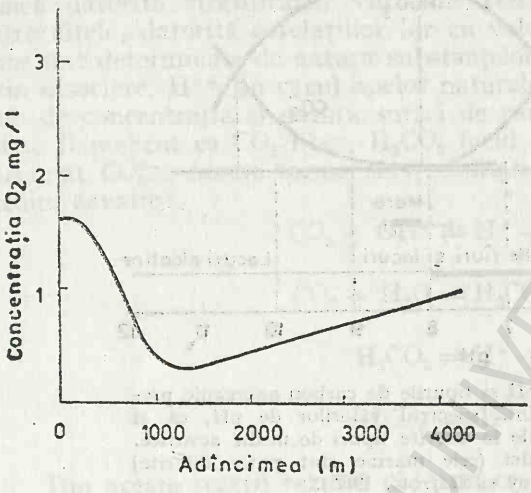



Fig. 251. — Variațiile concentrației oxigenului în raport cu adîncimea coloanei de apă.

*Sedimentele marine* prezintă o a doua zonare a concentrației $O_2$ (Atlas și Bartha, 1987). La suprafața lor, concentrația relativ mare de $O_2$ este asociată cu prezența nitraților, a Fe feric și cu o concentrație mică de $CO_2$.

Acești parametri se modifică progresiv cu adîncimea în așa fel încît, după o zonă intermediară de tranziție, se instalează o zonă de anaerobioză fundamental modificată prin: dispariția oxigenului, conversia $CO_2$ la metan, a nitraților și nitriților la ioni de amoniu și a Fe feric la Fe feros.

Zona profundă, anaerobă, este caracterizată prin acumularea de $H_2S$ în concentrații toxice pentru cele mai multe organisme (leagă Fe din citocromoxidază). Ea nu poate fi populată decît de bacteriile tolerante la $H_2S$, care îl folosesc ca sursă de energie (bacteriile sulfuroase chemoautotrofe), sau, în anumite condiții, ca sursă de iluminare slabă de către bacteriile purpurii sau verzi, care îl folosesc ca donator de H pentru a face fotosinteză anoxigenică.

### Salinitatea și compoziția ionică

Salinitatea și compoziția ionică reprezintă proprietăți care diferențiază net mediile acvatice dulci de cele marine și oceanice, și, în consecință, influențează în mod categoric natura microorganismelor care le pot popula. Numai puține microorganisme pot fi întîlnite în ambele tipuri de ape.

Concentrația medie a sărurilor în apele oceanice este de 3,5% (3,2—3,8%). Există și cazuri extreme, cum este cel reprezentat de Marea Moartă, care, în condiții de iradiere solară intensă, conține 340 g săruri la litru, în special sub formă de NaCl și $MgCl_2$. Spre deosebire de lacurile sărate și de unele bazine acvatice mici, în mod normal, compoziția ionică și salinitatea apelor oceanului deschis sînt relativ constante. Fac excepție mările interioare, care suferă în zona estuarelor un proces de diluție masivă, la gura marilor afluenți, cu formarea unui gradient de salinitate la interfața apelor dulci cu cele marine.

Aproximativ 99% din sărurile dizolvate sînt formate prin combinarea a 10—12 ioni anorganici majori (tabelul nr 50), cărora li se adaugă, în concentrații uneori foarte mici (de ordinul a $1 \times 10^{-10}$ mg/l), un număr mare (aproape pe jumătate) din elementele identificate pînă în prezent (în principal, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo) (Jannasch și Wirsen, 1984; Rheinheimer, 1985). Se apreciază că microelementele care afectează metabolismul bacteriilor și al organismelor, în general, sînt prezente în apa mării în concentrații cuprinse între 0,1 și 50 μg/l. Multe dintre elementele minore din apele oceanice sînt concentrate de sute de mii de ori, prin fenomene de bioacumulare, în celulele microorganismelor, ale plantelor sau ale animalelor marine.

*Tabelul nr. 50*

**Principalii ioni anorganici prezenți în mod normal în apa de mare**

| Ionii | Concentrația (g/l) | Ionii | Concentrația (g/l) |
|---|---|---|---|
| $Cl^-$ | 19,630 | $Ca^{2+}$ | 0,408 |
| $Na^+$ | 10,770 | $Br^-$ | 0,066 |
| $Mg^{2+}$ | 1,295 | $H_3BO_3$ | 0,027 |
| $K^+$ | 0,390 | $F^-$ | 0,0013 |
| $SO_4^{2-}$ | 2,701 | $SR^{2+}$ | 0,014 |
| $HCO_3^-$ | 0,116 | Microelemente | 0,005 |
| $CO_3^{2-}$ | 0,012 | Total | 35,027 |

*Comportamentul microorganismelor în apa de mare și a lacurilor sărate* este diferit în funcție de natura lor și de habitatul lor normal:

1) Cele provenite din apele dulci sînt *halofobe*. Ca urmare, dacă sînt transferate brusc în mediul sărat nu rezistă decît o scurtă perioadă de timp, după care mor.

2) Cele *halotolerante*, în special cele *eurihaline*, supraviețuiesc, dar se dezvoltă mai lent decît în mediul lor natural.

3) Cele *halofile*, autohtone în mediul salin, nu se dezvoltă în apă dulce. Ele preferă o salinitate optimă de 2,5—4%. După Rheinheimer (1985), majoritatea microorganismelor halofile nu au nevoie de o presiune osmotică mărită, așa cum s-a crezut inițial. Este probabil că unele au o nevoie absolută de $Na^+$, iar altele de $Cl^-$. Microorganismele halofile dispun de sisteme osmoreglatoare de protecție, care implică participarea unuia sau a mai multor mecanisme (Stewart, 1983).

Unele microorganisme heterotrofe marine cum sînt fungii *Dendryphiella salina* sau *Asteromyces cruciatus*, precum și microalgele *Dunaliella tertiolecta* sau *D. viridis* realizează o echilibrare a mediului intern în raport cu cel extern prin acumularea de $K^+$, paralel cu excluderea $Na^+$. Alte microorganisme realizează acest echilibru prin acumularea unor osmoregulatori organici ca prolina, glucidele simple, poliolii (glicerina, manitolul, glucozil glicerolul) sau betaina ($C_5H_{11}NO_2$) (tabelul nr. 51).

Devierea de la salinitatea optimă are consecințe negative asupra bacteriilor, determinînd modificări morfologice sau fiziologice. Celulele bacilare sau cele cocoide devin filamentoase, iar durata unei generații este prelungită.

Creșterea salinității interferă cu procesul de reproducere: bacteriile cresc, dar nu se mai pot divide. Bacteriile halofile luminescente își pierd această proprietate în apa de mare diluată, prin inhibarea sintezei de luciferază, dar își revin după transfer într-o soluție de 3% NaCl.

*Tabelul nr. 51*

**Exemple de compuși organici acumulați de microorganisme ca răspuns la salinitatea crescută a unor medii acvatice** (după date din Stewart, 1983)

| Microorganismul | Compusul acumulat |
|---|---|
| **Bacterii heterotrofe** | Acidul γ-aminobutiric, glutamat |
| **Cianobacterii** | |
| *Aphanothece halophylica* | Betaină |
| *Synechococcus* sp. | Glucozilglicerol |
| **Fungi** | |
| *Chaetomium globosum* | Arabitol, glicerol, manitol |
| *Dendryphiella salina* | Arabitol, manitol |
| *Saccharomyces cerevisiae* | Glicerol |
| **Alge** | |
| *Chlorella pyrenoidosa* | Sucroză |
| *Cyclotella* sp. | Prolină |
| *Dunaliella salina* | Glicerol, aminoaciz |
| *Ochromonas melhamensis* | 1,4/2,5-ciclohexantetrol-izofluoridazid |
| | (0-α-D-galactopiranozil-(1,1)-glicerol |
| *Phaeodactylum tricornutum* | Prolină |

Analizînd prezența halofiliei în lumea microorganismelor, Stewart (1983) ajunge la concluzia că această proprietate este, cel mai adesea, asociată cu capacitatea de utilizare a energiei solare și de fixare a $CO_2$ prin fotosinteză. Ea este frecvent întîlnită în cazul algelor, al cianobacteriilor și al bacteriilor capabile de fotosinteză anoxigenică (*Anoxybacteria*). Aceasta demonstrează capacitatea microorganismelor fotoautotrofe de a se adapta cel mai bine la concentrațiile ionice mari și de a realiza un echilibru osmotic, care le permite să-și desfășoare activitatea metabolică într-un mediu în care — în calitate de producători primari — ele reprezintă sursa de C fixat și de energie. Această proprietate explică prezența fototrofelor în apele hipersaline (halobacteriile în Marea Moartă), în lacurile alcaline din Ciad și Etiopia (*Spirulina*) sau în izvorul termal salin din Yellowstone Park (cianobacterii).

Prin contrast, bacteriile chemoheterotrofe marine autohtone sînt reprezentate, după Baumann și Baumann (1981), numai de patru genuri: *Vibrio* (care include și genul *Beneckea*), *Alteromonas*, *Alcaligenes* și *Pseudomonas*.

Salinitatea apelor marine are influență asupra densității apei, asupra răspunsului microorganismelor la temperatură, determinînd o temperatură de îngheț mai scăzută, ceea ce modifică solubilitatea gazelor (fig. 252).

Apele dulci au o salinitate foarte redusă. Compoziția lor ionică este, de asemenea, diferită, fiind reprezentată în special de $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, carbonat, bicarbonat, $SO_4^{2-}$ și $Cl^{-}$. Ea variază în limite mai mari atît sub raport cantitativ global, cît și în proporția relativă a diferiților ioni (în principal $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}/Na^{+}$, $K^{+}$).

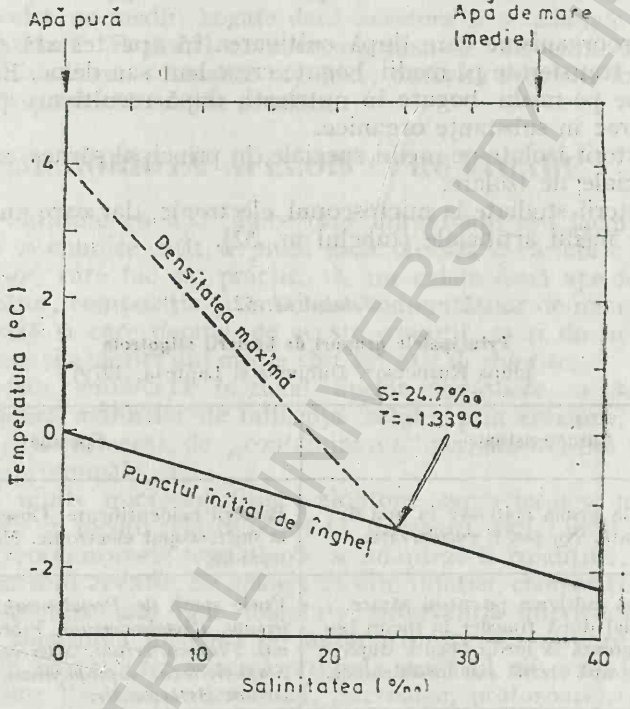



Fig. 252. — Influența salinității, temperaturii și densității maxime a apei de mare asupra punctului inițial de îngheț al acesteia (după Gross, 1971).

## Oligotrofia

Capacitatea microorganismelor acvatice de a se dezvolta în medii cu concentrații minime de substanțe organice a fost descrisă inițial de ZoBell și Grant (1943) și apoi de Jannasch (1965). Cu toată importanța sa ecologică fundamentală, conceptul de oligotrofie a rămas relativ ambiguu, fiind definit drept capacitatea de a crește cu viteză mare la concentrații mici de substanțe organice. Această proprietate le permite să domine în comunitățile bacteriene naturale din bazinele acvatice. Kuznetsov, Dubinina și Lapteva (1979) au făcut prima încercare de definire mai riguroasă, precizînd că atributul de oligotrof se aplică numai bacteriilor acvatice care se dezvoltă *la prima cultivare in vitro* pe medii cu un conținut de 1—15 mg C organic dizolvat la litru și care cresc pe aceste medii și în recultivările ulterioare, deși se pot adapta și cu medii de concentrații mai mari de substanțe organice.

**Tipurile de bacterii oligotrofe.** Kuznetsov, Dubinina și Lapteva (1979) propun gruparea bacteriilor oligotrofe în patru grupuri, în funcție de răspunsul lor față de substanțele organice din mediu:

1) Organisme care se dezvoltă la prima cultivare pe apa sterilizată provenită din bazinul studiat, dar care nu se mai dezvoltă în recultivările ulterioare nici pe medii sărace și nici pe medii bogate. Grupul este format din bacterii neidentificate, studiate doar pe baza morfologiei la microscopul electronic.

2) Microorganisme care după cultivarea în apa testată (sterilizată în prealabil) și transferate pe medii bogate cresc lent sau deloc. Ele încep să se dezvolte bine pe medii bogate în nutrienți, după recultivare pe apă sterilă sau agar, sărac în substanțe organice.

3) Bacterii izolate pe medii speciale, în principal sărace, sau chiar prin metode speciale de izolare.

4) Bacterii studiate la microscopul electronic, dar care nu au fost încă cultivate pe medii artificiale (tabelul nr. 52).

*Tabelul nr. 52*

**Principalele grupuri de bacterii oligotrofe**
(după Kuznetsov, Dubinina și Lapteva, 1979)

| Caracteristicile | Speciile |
|---|---|
| Cresc numai la prima cultivare în apa de testat sterilizată. Nu pot fi recultivate. | Bacterii neidentificate. Observate numai la microscopul electronic. Morfologie neobișnuită. |
| Cresc la prima cultivare pe medii sărace. Nu cresc inițial după transfer în medii bogate. Se adaptează la medii bogate după recultivare pe apă sterilă sau medii sărace. | Unele specii de *Pseudomonas, Agrobacterium, Photobacterium, Vibrio, Aeromonas, Flavobacterium, Micrococcus roseus, Staphylococcus saprophyticus, Corynebacterium, Arthrobacter.* |
| Bacterii izolate sau cultivate numai pe medii sărace speciale. | Specii de *Hyphomicrobium, Caulobacter, Microcyclus, Leptothrix, Ochrobium, Metallogenium, Pasteuria.* |
| Bacterii detectate în mediile acvatice naturale numai prin microscopie electronică. Necultivabile în laborator. | Bacterii prostecate. Numeroase au vacuole cu gaze. |

**Adaptări la oligotrofie.** Bacteriile oligotrofe au dezvoltat în cursul evoluției mai multe mecanisme menite să le asigure existența în prezența unor concentrații minime de nutrienți, între care cele mai importante sînt următoarele:

1) capacitatea de a înglobă cu mare eficiență nutrienții prezenți în concentrații minime în mediu;

2) prezența unor structuri specializate, cum este prosteca, reprezentînd un avantaj adaptativ important pentru fixarea pe diferite substraturi și prin mărirea suprafeței de absorbție pentru transportul intracelular al nutrienților.

Durata unei generații în cazul bacteriilor oligotrofe este de 4,0—8,0 ore, cu unele variații individuale (*Arthrobacter* și *Corynebacterium pleomorphum* 4,0 ore; *Pseudomonas mira* 6,7 ore; *Mycobacterium phlei* 8,8 ore etc.).

Incapacitatea bacteriilor oligotrofe de a se dezvolta pe medii bogate în nutrienți s-ar datora, probabil, producerii unor metaboliți toxici. Cele mai multe microorganisme oligotrofe produc $H_2O_2$, dar nu au catalază pentru a o degrada. Importanța acestui mecanism este demonstrată de faptul că ele se pot dezvolta pe medii bogate dacă acestora li se adaugă o anumită cantitate de catalază. Probabil că microorganismele oligotrofe se dezvoltă în apele contaminate cu substanțe organice, datorită asocierii lor cu organisme copiotrofe producătoare de catalază.

## MICROBIOTA APELOR CURGĂTOARE

Bazinele naturale cu apă dulce (ape curgătoare sau lacuri) prezintă diferențe fizice și chimice atît de mari încît creează o varietate enormă de condiții ecologice, care fac ca, practic, să nu existe două ape identice. În mod corespunzător, compoziția și mărimea comunităților de microorganisme care le populează și care depind de aceste condiții, ca și de interacțiunile cu factorii biotici și abiotici din mediu sînt tot atît de diferite.

Situația este complicată în cazul apelor curgătoare, a lacurilor mai mici și în regiunea malurilor de influența solului prin eroziune, dizolvarea și spălarea de către afluenți, de „contaminarea" permanentă din aer, de resturile vegetale și animale etc.

Cele mai multe microorganisme alohtone supraviețuiesc numai temporar. Solul este un mediu relativ bogat în nutrienți, astfel încît supraviețuiesc numai microorganismele capabile să se adapteze la condițiile, în general, oligotrofe din mediul acvatic. Se adaugă efectul diluției, competiția cu microorganismele autohtone mai bine adaptate, intervenția diferiților agenți litici etc., care determină un efect de autopurificare. Ca urmare, stabilirea unor coordonate cu caracter general privind numărul, diversitatea pe grupuri de organisme (bacterii, microfungi, microalge, protozoare), pe grupuri fiziologice sau sistematice nu este posibilă și este lipsită de orice semnificație.

*Ea își păstrează însă caracterul de importanță fundamentală pentru caracterizarea unui ecosistem acvatic individual, pentru înțelegerea proceselor fundamentale care asigură circulația materiei și energiei, productivitatea și însăși existența vieții în ecosistemul respectiv.*

## MICROBIOTA IZVOARELOR

*Izvoarele* reprezintă medii acvatice naturale formate prin apariția la suprafața terestră a apelor subterane. Diferă foarte mult ca debit, temperatură și compoziție chimică, în funcție de condițiile geologice specifice. În apropiere de sursă sînt oligotrofe, datorită conținutului foarte redus în nutrienți. Microbiota specifică este foarte redusă și formată din microorganisme provenite din acvifere sau „spălate" din straturile subterane în cursul trecerii spre suprafață. Este formată, în special, din bacterii Gram-negative (*Pseudomonas* sp.) și forme prostecate (*Hyphomicrobium, Caulobacter* etc.). Numărul total este de cîteva mii — zeci de mii/ml, iar cel al bacteriilor saprofite (coci sau bacili scurți) de la cîteva zeci la cîteva sute/ml.

Izvoarele „specializate" sînt de două tipuri:

1) *Izvoarele minerale* sînt caracterizate printr-un conținut ridicat de săruri minerale dizolvate de apele care străbat diferitele formațiuni geologice în drumul lor spre suprafață. Natura acestor săruri și concentrația lor sînt dependente de natura rocilor respective.

În cazul izvoarelor minerale care conțin compuși ai Fe au fost evidențiate frecvent bacteriile: *Gallionella ferruginea, Leptothrix ochracea, Crenothrix polyspora* etc.

În apele minerale sulfuroase predomină bacteriile sulfuroase purpurii și incolore.

2) *Izvoarele termale* își au originea în regiunile vulcanice și provin, în general, de la adîncimi mari. Au temperaturi mai mari de 50°C, care permit numai dezvoltarea organismelor procariote. În funcție de particularitățile geologice locale, pot fi acide (datorită concentrației mari de acid carbonic) sau sărate (săruri de Mg, Fe sau sulf).

Dintre bacteriile izolate mai frecvent sînt menționate *Sulfolobus acidocaldarius* (75°C) și *Leptothrix thermalis* (90°C).

Brock (1967) a studiat gheizerul din Yellowstone Park, care proiectează la intervale de timp jeturi de apă fierbinte la mari înălțimi. El a urmărit dezvoltarea microorganismelor în gradientul termic format, înregistrînd prezența cianobacteriilor *Synechococcus lividus* la 74°C, *Mastigocladus laminosus* la 57°C și *Calothrix* la 47°C.

Rheinheimer (1985) completează lista acestora cu specii de *Aphanocapsa, Pleurocapsa, Phormidium* și *Spirulina*, nedeosebite, cel puțin aparent, de omologii lor care trăiesc în apele mai reci.

## MICROBIOTA RÎURILOR

Spre deosebire de lacuri, apele curgătoare oferă condiții foarte diferite pentru dezvoltarea microorganismelor în funcție de un număr mare de factori variabili ca, de exemplu:

1) viteza de curgere;

2) debitul (volumul total care trece printr-un punct la un moment dat pe unitatea de timp, la rîndul său dependent de temperatură și precipitații);

3) adîncimea;

4) conținutul mineral dependent de condițiile geologice.

Spre deosebire de apele stagnante, mărimea deosebită a interfeței cu litosfera de-a lungul malurilor și spălarea acestora de cursul mai mult sau mai puțin rapid determină fenomene de eroziune, de îmbogățire cu substanțe minerale și organice din sol, de la cele mai simple la acizii humici, precum și cu microorganisme alohtone. Se adaugă efectele spălării solului prin precipitații și aportul de substanțe al afluenților.

Influența acestor factori variabili este diferită de-a lungul rîurilor. Cursul superior, mai pur și mai clar, cu mare grad de oxigenare, curgere mai rapidă și temperatură scăzută, în general mai puțin însorit, deoarece străbate adesea regiuni împădurite, are o productivitate primară redusă. Pe cursul mediu se observă o scădere a vitezei de curgere, temperatura este mai mare și productivitatea primară mai semnificativă. Încep să se manifeste influențele antropogene. Cursul inferior, mai lent, cu depunere de sedimente și turbiditate crescută manifestă, de regulă, influențele majore ale regiunilor

străbătute, putînd fi poluat cu îngrășăminte și pesticide agricole, cu ape uzate orășenești sau industriale, cu metale grele, cu numeroși compuși toxici etc.

După gradul de poluare pot exista trei tipuri majore:

1) *ape oligosaprobe* caracterizate printr-o mare concentrație de $O_2$, un conținut redus de substanță organică dizolvată și un nivel scăzut de descompunere organică;

2) *ape mezosaprobe*, avînd un grad mediu de poluare, asociat cu diminuarea concentrației de $O_2$ și un nivel moderat de degradare a substanțelor organice;

3) *ape polisaprobe* cu o foarte mare concentrație de materie organică și o concentrație redusă sau chiar absența oxigenului.

În general, rîurile mari și fluviile tind să fie mai uniforme decît cele mici, care sînt mai profund afectate de factorii locali, de activitățile umane etc. (Rheinheimer, 1985).

Aceste particularități conferă rîurilor și apelor curgătoare în general o mare diversitate de condiții, căreia îi corespunde o mare variabilitate în structura comunităților de microorganisme.

Multe dintre acestea sînt atașate de diferite substraturi solide, cum sînt rocile și pietrișul submers. Pe lîngă efectul de menținere și neutralizare a efectelor curenților de apă, aceste microorganisme absorb rapid diferiți nutrienți dizolvați, adaptare foarte utilă în mediile oligotrofe. După moartea și descompunerea celulelor lor, nutrienții din structura acestora sînt preluați de alte organisme, la distanță, în aval. Datorită acestui fenomen, o parte din nutrienți nu se deplasează cu viteza curenților, ci au o mișcare mult mai lentă (Atlas și Bartha, 1987). Fenomenul demonstrează, totodată, că circulația nutrienților în rîuri nu evoluează pe loc, ca în lacuri, ci implică un transport la vale înaintea completării ciclului. De aceea, drumul lor poate fi mai degrabă ca o spirală decît ca un ciclu („Nutrient spiralling", Newbold și colab., 1981).

Microbiota rîurilor este atît de diferită în funcție de condițiile locale încît nu se poate sintetiza într-o listă a principalelor specii prezente în mod constant.

Situația este complicată de numărul mare și de diversitatea microorganismelor alohtone provenite din sol, precipitații și afluenți, în cazul rîurilor curate, și din diferite surse de contaminare, în cazul celor cu diferite grade de poluare. În general, microorganismele alohtone duc o existență efemeră, datorită incapacității de acomodare la condiția oligotrofă (în rîurile curate), la efectele radiațiilor UV și ale competiției, bacteriofagilor, protozoarelor bacterivore.

Un număr relativ mic de bacterii sînt liber înotătoare, cele mai multe fiind legate de diferite substraturi solide (particule plutitoare, fitoplancton, animale acvatice). Celulele bătrîne ale fitoplanctonului sînt mai bogat infectate decît cele tinere. Animalele mai evoluate infectate atît pe suprafața corpului, cît și în tubul digestiv pot transporta bacteriile patogene în amonte, contra curentului, față de punctul de contaminare a apei.

În afara bacteriilor provenite din sol (*Azotobacter* sp., bacterii nitrificatoare etc.), rîurile conțin comunități bacteriene ce se diversifică pe măsura îndepărtării de izvoare. Între cele mai frecvent întîlnite sînt de menționat cele din genurile: *Achromobacter, Acinetobacter, Caulobacter, Flavobacterium, Hyphomicrobium, Moraxella, Pseudomonas, Gallionella.*

În apele eutrofizate predomină, în general, *Bacillus* sp. și *Pseudomonas* sp., iar în cele poluate cu o microbiotă bogată, extrem de diversificată, sînt întîlnite frecvent: *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Sphaerotilus natans*, *Zoogloea ramigera*, *Clostridium* sp. etc.

*Biomasa bacteriană* prezentă în rîuri și în fluvii este corelată cantitativ cu bogăția în nutrienți. Rheinheimer (1985) citează cazul fluviului Elba în care la nivelul localității Lannenburg, biomasa bacteriană a oscilat în cursul anului 1975 între 173 și 973 g/s, respectiv între 149 467 și 84 067 kg/zi. Cantitatea totală de biomasă bacteriană purtată de acest fluviu în anul 1975 (11 000 tone bacterii sau 1 100 tone C) reprezintă o contribuție majoră de nutrienți pentru fluviul respectiv.

*Producția primară* este, de asemenea, variabilă în funcție de proprietățile rîului.

Rîurile mari și lente sînt mai bogat și mai divers populate. Ele permit prezența planctonului *(potamoplancton)* (gr. „Potamein" = care aparține rîului sau care este transportat de curenții din rîuri) și chiar multiplicarea lui, în timp ce rîurile repezi și oligotrofe au o producție primară foarte redusă. În afara diferitelor grupuri de alge, care se dezvoltă numai pe suprafața pietrelor sau a rocilor submerse. Rheinheimer (1985), precum și Atlas și Bartha (1987) semnalează prezența frecventă a cianobacteriilor libere *(Microcystis aeruginosa, M. flos-aquae, Aphanizomenon flos-aquae* etc.) sau atașate de diferite substrate *(Hydrocapsa, Pleurocapsa, Chamaesiphon* etc.) pentru a rezista curentului. *Microfungii* diferă, de asemenea, în funcție de concentrația de nutrienți.

În pîraiele curate și repezi este prezent *Sapromyces*. În rîurile bogate în substanțe organice asimilabile se adaugă numeroși *Fungi imperfecți* și *Ascomycetes*, iar în cele poluate, pe lîngă levuri, apar fungi specifici („Sewage fungi") ca: *Leptomitus, Saprolegnia, Phytium*. Rîurile pot, de asemenea, conține o serie de fungi paraziți pe rădăcinile plantelor acvatice sau pe animale.

## LACURILE, MEDII NATURALE PENTRU MICROORGANISME

Lacurile sînt bazine acvatice stagnante, localizate în depresiuni ale scoarței terestre cu origine tectonică, vulcanică, glaciară sau clastocarstică.

În funcție de concentrația sărurilor, conțin apă dulce, salmastră sau sărată.

Au adîncimi variabile, de la cîțiva metri pînă la >1000 m (lacul Tanganika 1 435 m; lacul Baikal 1 741 m) și volum variabil în funcție de suprafață și adîncime (cel mai mare, lacul Bratskaia avînd $1 \times 10^{10}$ m$^3$). Unele dintre ele sînt alimentate din rîuri, altele de ape subterane.

În funcție de gradul de iluminare, lacurile cuprind mai multe zone cu semnificație importantă pentru prezența microorganismelor și activitatea în habitatele respective:

**Zona eufotică,** situată la suprafață, primește o cantitate de radiații solare ce permit dezvoltarea organismelor fotoautotrofe și fotosinteza. Este, în consecință, zona cu cele mai favorabile condiții pentru o productivitate primară mare.

Ea cuprinde două subzone:

*Subzona litorală*, integral iluminată, situată de-a lungul malurilor, este populată de bacterii originare din sol, alge filamentoase și plante parțial submerse sau submerse.

*Subzona limnetică*, de larg, este populată de alge planctonice ca producători primari și diferite alte categorii de microorganisme (în special bacterii).

Limita sa în adîncime este reprezentată de *nivelul de compensare*, care corespunde nivelului în care activitatea de fotosinteză echilibrează activitatea respiratorie. Se apreciază că la acest nivel intensitatea luminii solare atinge 1% din intensitatea globală.

Fotosinteza continuă și sub această limită, diminuînd progresiv ca intensitate în așa fel încît nu reușește să compenseze ceea ce se consumă prin activitatea respiratorie (fig. 253).

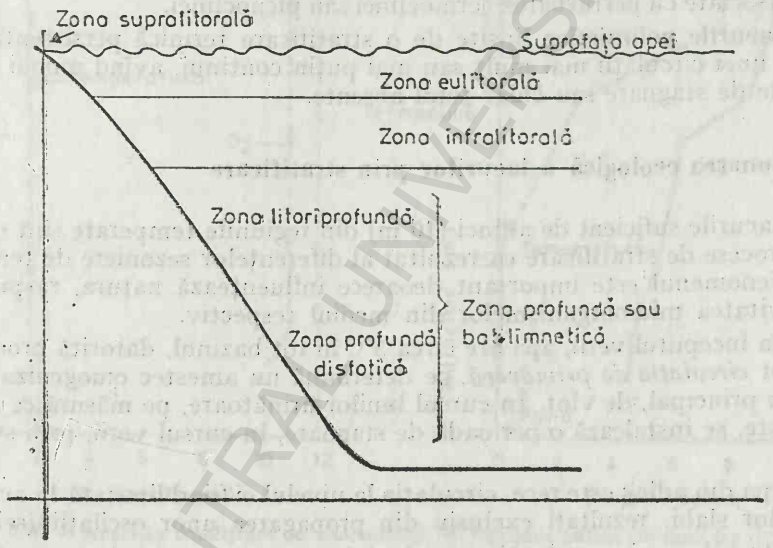



Fig. 253. — Zonele ecologice ale unui lac (după Lincoln, Boxshall și Clark, 1982).

**Zona profundă (disfotică)** situată sub nivelul de pătrundere eficientă a luminii, include un volum de apă dominat de organisme și microorganisme din categoria producătorilor secundari. Natura și densitatea lor sînt variabile în funcție de materia organică prezentă.

**Zona bentică**, afotică, la adîncimi mai mari, corespunde sedimentului bogat în nutrienți particulați, care suferă procesul permanent de depunere, din straturile superioare. Zona este abundent populată de microorganisme heterotrofe, care degradează materialul organic în aerobioză la suprafața sedimentului și în anaerobioză în părțile mai adînci ale acestuia.

### Clasificarea lacurilor în raport cu circulația apei

Deși lacurile sînt considerate, prin definiție, ca ape stagnante, în realitate sînt supuse unor curenți cu orientări diferite și mai complicate (ascen-

dente, descendente, orizontale, verticale, valuri etc.) decît riurile, în care deplasarea majoră este unidirecțională, determinată de gravitație, de la regiuni mai înalte spre nivelul mării. Frecvent, aceste deplasări sînt corelate cu schimbările sezoniere de temperatură.

**Lacurile holomictice** sînt caracterizate printr-o circulație complet liberă, în toată coloana de apă, în cursul întregului sezon estival, ca și în momentul scăderii de temperatură din iarnă.

**Lacurile oligomictice** prezintă o stratificare relativ stabilă, cu numai rare sau foarte lente perioade de circulație și amestec.

**Lacurile meromictice** sînt lacuri permanent stratificate, cel mai adesea ca rezultat al unor diferențe chimice între epilimnion și hipolimnion, care creează un gradient de densitate (picnoclină).

**Lacurile dimictice** prezintă două perioade sezoniere de circulație liberă a apei asociate cu perturbarea termoclinei sau picnoclinei.

**Lacurile polimictice** lipsite de o stratificare termică persistentă, sînt supuse unei circulații mai mult sau mai puțin continui, avînd numai scurte perioade de stagnare sau chiar total absente.

## Zonarea ecologică a lacurilor prin stratificare

Lacurile suficient de adînci (10 m) din regiunile temperate sînt expuse unor procese de stratificare ca rezultat al diferențelor sezoniere de temperatură. Fenomenul este important deoarece influențează natura, răspîndirea și activitatea microorganismelor din mediul respectiv.

La începutul verii, apa are circa 3°C în tot bazinul, datorită procesului denumit *circulația de primăvară*, ce determină un amestec omogenizat, realizat, în principal, de vînt. În cursul lunilor următoare, pe măsură ce apa se încălzește, se instalează o perioadă de stagnare, în cursul verii, prin stratificare.

Apa din adînc este rece, circulația la nivelul ei fiind limitată la acțiunea curenților slabi, rezultați exclusiv din propagarea unor oscilații (seiche)*.

Stratul suerior se încălzește și nu se amestecă cu cel rece, creînd o zonă cu un gradient de temperatură numit termoclină**, în care schimbarea de temperatură are loc cu o rată mare, în raport cu adîncimea (1°C pentru fiecare metru de adîncime). Această stratificare acționează ca o barieră față de schimbul de nutrienți și $O_2$, în special în apele calme (fig. 254).

Toamna, temperatura scade, straturile de apă devin mai puțin stabile și, în consecință, se produce *circulația de toamnă* a apei, care este urmată de o stagnare de iarnă, cînd gheața acoperă suprafața lacului (Gorlenko, Dubinina și Kuznetsov, 1983; Rheinheimer, 1985).

---

* *Seiche* — termen derivat, probabil, din germ. „Seiche" — utilizat ca atare în franceză și engleză. Descrie oscilațiile ca o undă ale apei în bazinele acvatice închise sau semiînchise, care continuă după încetarea forței care le-a generat (vînt, ploaie puternică sau în cazul celor de suprafață modificări ale presiunii barometrice).

** *Clină* (de la gr. „Klinein"), termen generic, exprimînd gradientul unui caracter, respectiv variația lui continuă în exprimare (de exemplu, chemoclină, picnoclină etc). Termoclina este o regiune de graniță între stratul de apă superior și cel inferior, în care temperatura se modifică evident în raport cu adîncimea.

În urma acestui proces, în cursul perioadelor de vară, apele lacurilor adînci sînt stratificate, realizînd trei tipuri de habitate cu proprietăți distincte:

*Epilimnionul*, corespunzător regiunii superioare a lacului, include întreaga masă de apă situată deasupra termoclinei. Conține apă caldă, circulantă, bogată în oxigen dizolvat, intens iluminată. În consecință, permite dezvoltarea masivă a algelor fitoplanctonice.

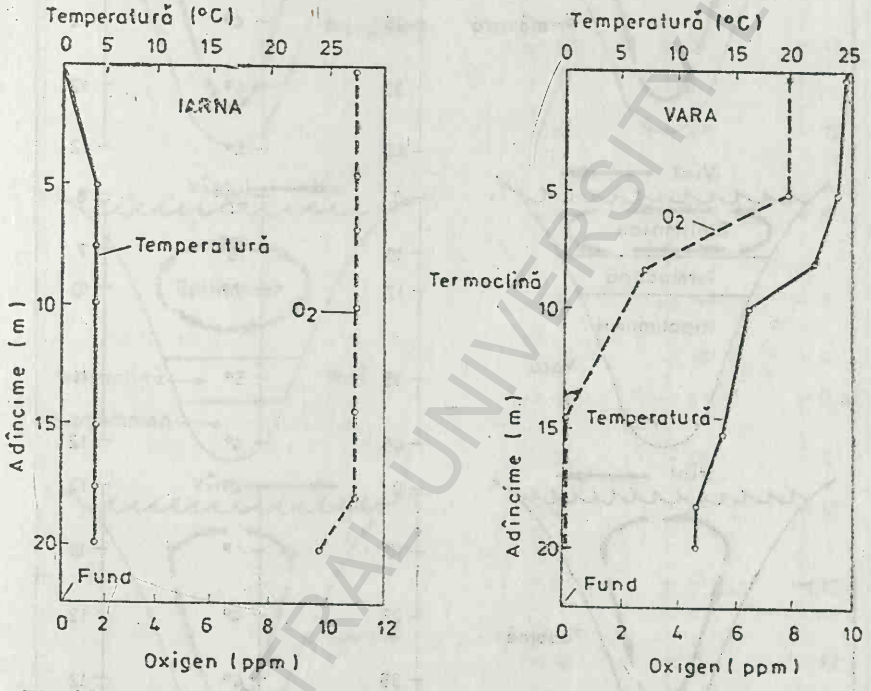



Fig. 254. — Apariția condițiilor de anaerobioză în regiunile adînci ale unui lac din zonele temperate, datorită faptului că apele de sub termoclină sînt mai reci și mai dense decît cele de suprafață.

*Metalimnionul* — regiunea intermediară între epilimnion și hipolimnion — este zona caracterizată prin gradient brusc al condițiilor fizicochimice. Are o deosebită importanță biologică, deoarece, fiind o regiune de graniță, conține, în același timp, influențe din epilimnion ($O_2$ dizolvat) și nutrienți dizolvați din regiunile inferioare.

*Hipolimnionul* este zona situată între metalimnion și sediment. În lacurile oligotrofe are un volum mare în raport cu structurile superioare. Conține apă rece, puțin oxigen dizolvat și este slab iluminată, fiind improprie fotosintezei, care evoluează cu o rată foarte redusă (fig. 255).

Procesele de respirație pot determina epuizarea oxigenului existent și apariția anaerobiozei, care creează numeroase nișe individuale ce adăpostesc grupuri diferite de microorganisme.

În lacurile eutrofe, hipolimnionul este mult redus ca volum (fig. 256). Oxigenul este consumat pînă la dispariția totală. După Rheinheimer (1985),

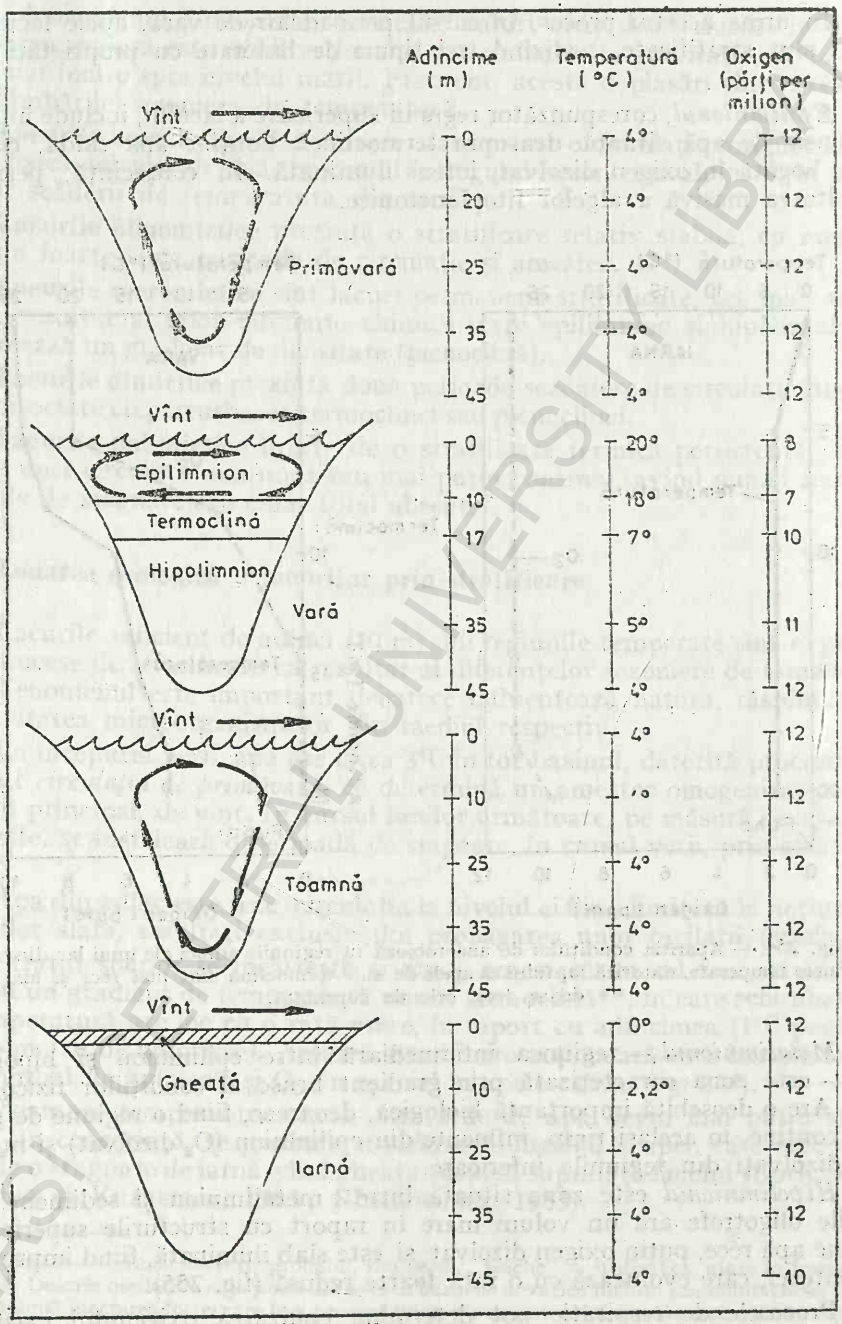



Fig. 255.—Reprezentarea schematică a modificărilor sezoniere într-un lac eutrofic din regiunile temperate. Temperaturile și concentrația $O_2$ la diferite adîncimi sînt orientative, deoarece ele variază în orice lac de-a lungul fiecărui anotimp și, în plus, fiecare lac are particularități proprii, diferite de cele ale altor lacuri similare, în orice moment (după Benton și Werner jr., 1974).

BCU IASI / CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

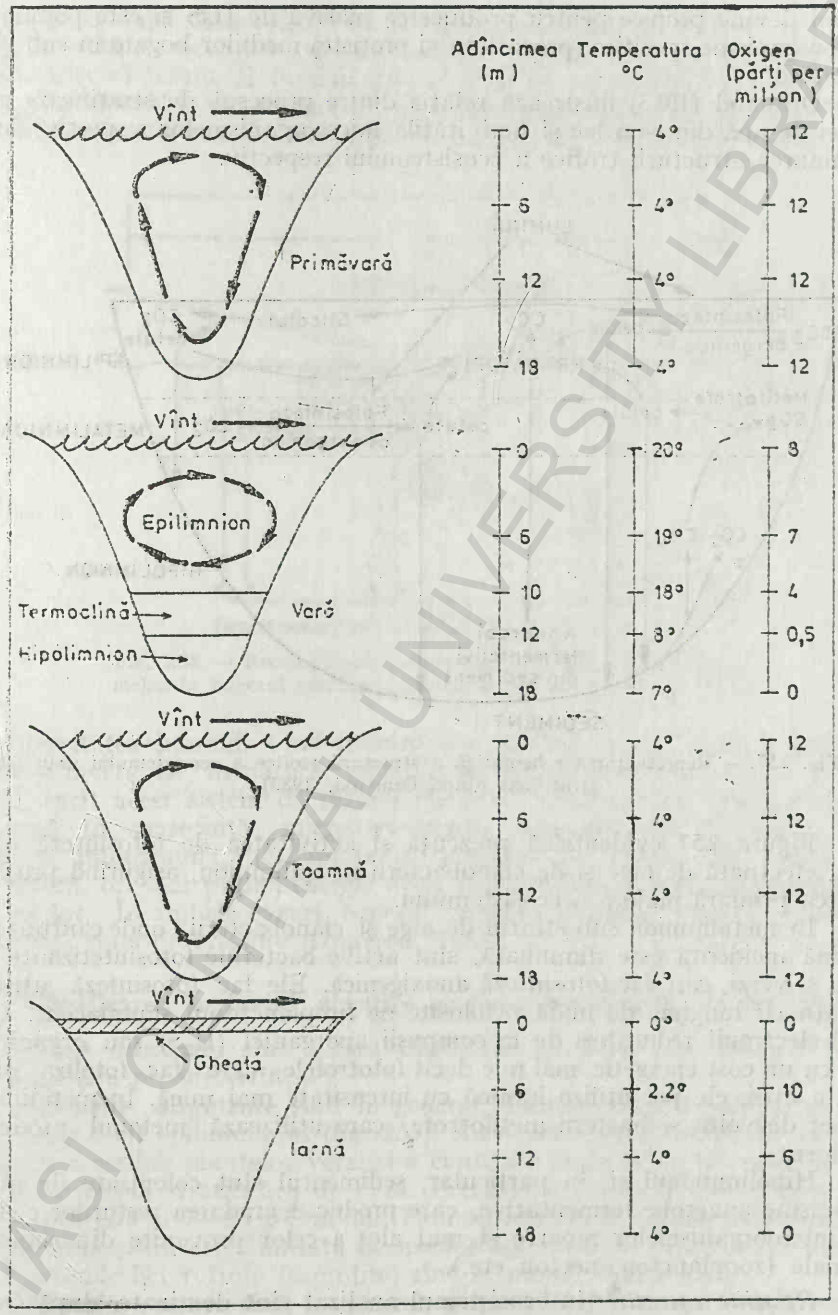



Fig. 256. — Reprezentarea diagramatică a modificărilor sezoniere într-un lac oligotrof din regiunile temperate. Temperaturile și concentrația $O_2$ la diferite adîncimi sînt orientative, deoarece ele variază în orice lac de-a lungul fiecărui anotimp și, în plus, fiecare lac are particularități proprii, diferite de cele ale altor lacuri similare, în orice moment (după Benton și Werner jr., 1974).



BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mediul devine propice pentru producerea masivă de $H_2S$ și este populat de microorganisme specifice (procariote și protiste) mediilor bogate în sulf *(Sulfurete)*.

Ormerod (1983) ilustrează relația dintre procesul de stratificare a coloanei de apă dintr-un lac și activitățile microorganismelor respective în determinarea structurii trofice a ecosistemului respectiv.

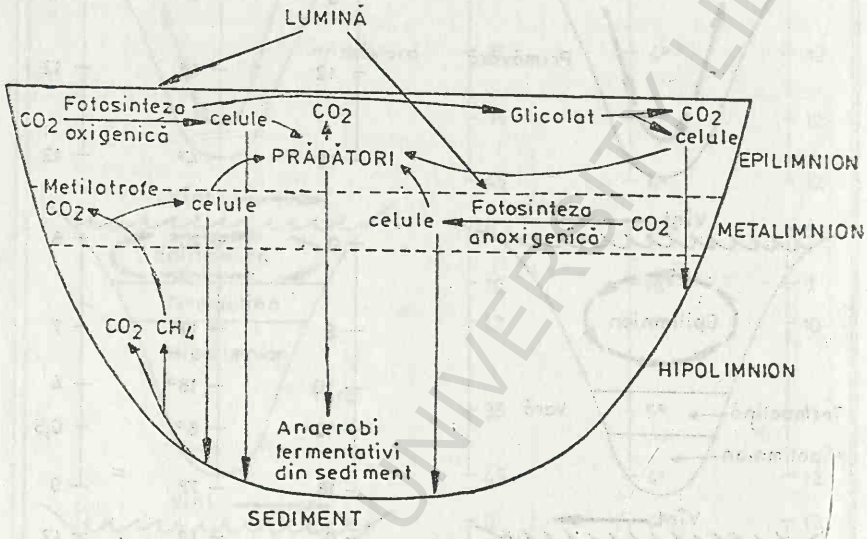



Fig. 257. — Reprezentarea schematică a structurii trofice a ecosistemului unui lac stratificat (după Ormerod, 1983).

Figura 257 evidențiază prezența și activitatea de fotosinteză oxigenică, efectuată de alge și de cianobacterii în epilimnion, asigurînd productivitatea primară majoră a ecosistemului.

În metalimnion sub stratul de alge și cianobacterii, unde cantitatea de lumină incidentă este diminuată, sînt active bacteriile fotosintetizante purpurii și verzi, care fac fotosinteză anoxigenică. Ele fac fotosinteză utilizînd radiații cu lungime de undă nefolosite de fitoplanctonul supraiacent. Obținînd electronii reducători de la compușii anorganici ($H_2S$) sau organici cu sulf cu un cost energetic mai mic decît fototrofele, care fac fotoliza oxigenică a apei, ele pot utiliza lumină cu intensitate mai mică. În metalimnion se pot dezvolta și bacterii metilotrofe, care utilizează metanul produs în sediment.

Hipolimnionul și, în particular, sedimentul sînt colonizate de microorganisme anaerobe fermentative, care produc degradarea resturilor celulare ale microorganismelor moarte și mai ales a celor provenite din cadavrele animale (zooplancton, necton etc.).

*Relațiile energetice* în ecosistemul analizat sînt dominate, după Ormerod (1983), de modul foarte puțin eficient de utilizare a radiațiilor solare (fig. 258). Pe baza unor date experimentale, el consideră că numai o mică parte (0,01—1%) din energia radiantă incidentă este convertită în energie chimică, restul fiind disipat în coloana de apă sub formă de căldură. Expli-

cația rezidă, după Ormerod, în efectul potențial nociv al luminii, care „obligă" fototrofele acvatice „să nu recolteze" decît o fracțiune minoră din radiații. Efectul lezant al luminii este mediat de constituenți sensibilizatori, cum este clorofila, și atenuat de pigmenții protectori carotenoizi. Sinteza clorofilei este afectată de temperatură, de factori nutriționali și, în special,

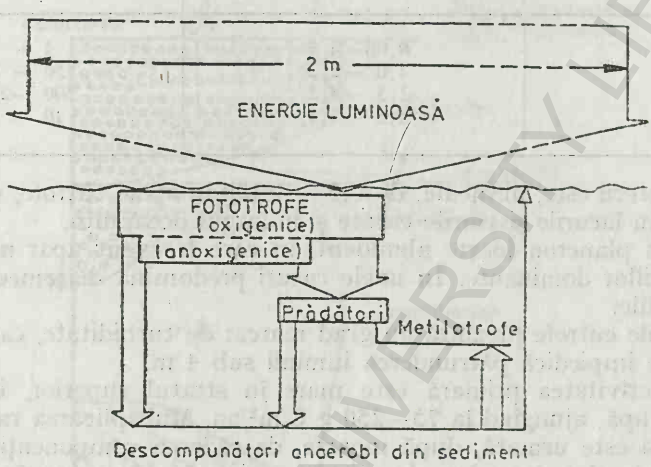



Fig. 258. — Reprezentarea schematică a rolului microorganismelor în bugetul energetic al unui lac (după Ormerod, 1983).

de intensitatea luminii. Cînd intensitatea luminii crește, sinteza clorofilei scade și invers. Or, în natură, variațiile pe termen scurt sînt atît de frecvente, încît acest sistem de reglare nu poate răspunde cu promptitudinea necesară. În consecință, microorganismele fototrofe din epilimnion sînt aproape întotdeauna neadaptate la condițiile de mediu. Ele absorb ori mai multă, ori mai puțină energie decît poate utiliza aparatul fotosintetic al celulei lor. În ambele cazuri, bugetul energetic deficitar are drept rezultat reducerea ratei de creștere (Ormerod, 1983).

### Clasificarea bazinelor acvatice pe baza gradului lor de troficitate

Apele interioare sînt adesea clasificate pe baza concentrației lor în nutrienți și a productivității.

**Lacurile oligotrofe** sînt, în general, adînci, cu un hipolimnion mult mai mare decît epilimnionul (fig. 255). Au o concentrație mică de nutrienți minerali accesibili plantelor verzi și o cantitate mare de $O_2$ în regiunile inferioare în timpul stratificării de vară. Prezintă o productivitate primară redusă, apreciată la 7—25 g C/m²/an. Fauna prezentă în regiunea de fund este diversificată și nu este limitată la speciile tolerante la concentrații mici de $O_2$. Bacteriile heterotrofe (saprofite) sînt în număr foarte mic.

**Lacurile eutrofe** sînt, în general, puțin adînci și conțin o apă eutrofă (bogată în nutrienți). Au un hipolimnion foarte mult diminuat, stagnant și foarte sărac în oxigen (fig. 256). Conțin un număr mare de microorganisme saprofite, care reprezintă un indicator important al stării trofice (tabelul nr. 53). În general se consideră că proporția saprofiților față de numărul

*Tabelul nr. 53*

**Corelația dintre numărul total al microorganismelor și cel al saprofitelor în funcție de tipul trofic al lacurilor** (după Gorlenko, Dubinina și Kuznetsov, 1983)

| Tipul trofic | Numărul total $\times 10^6$/ml | Nr. saprofite/ml |
|---|---|---|
| Oligotrof | 0,06—1,3 | 1 — 10 |
| Mezotrof | 1,0 —2,2 | 50 — 200 |
| Eutrof | 2,3 —8,2 | 500 —2000 |
| Distrof | 1,8 —3,8 | 10 — 100 |

total de bacterii este, în medie, de 1:5 — 1:100 în apele eutrofe, și de 1:1000 —1:10 000 în lacurile și riurile curate și în largul oceanului.

Au un plancton foarte abundent, în care frecvent apar modificări în natura speciilor dominante. În unele cazuri predomină diatomeele, în altele cianobacteriile.

Lacurile eutrofe prezintă un grad marcat de turbiditate, care formează un ecran ce împiedică pătrunderea luminii sub 4 m.

Productivitatea primară este mare în stratul superior, iluminat, al coloanei de apă, ajungînd la 75—250 g C/m²/an. Multiplicarea rapidă a fitoplanctonului este urmată, după moarte, de căderea componenților acestuia la fund, unde sînt degradați de microorganismele descompunătoare, cu un consum important de $O_2$. Final, microorganismele aerobe sînt înlocuite de anaerobe, de bacteriile sulfat-reducătoare și de bacteriile sulfuroase incolore. Are loc o creștere a concentrației și o acumulare de $H_2S$. Fauna de fund, care poate fi formată dintr-un număr mare de exemplare este puțin diversificată și restrînsă la speciile care tolerează concentrații mici de oxigen.

În lacurile stratificate în cursul verii, hipolimnionul poate fi atît de mic și materialele organice atît de abundente încît este stagnant (lipsit de curenți).

Toamna, cînd datorită reducerii temperaturii are loc circulația apei, izbucnesc „înfloriri" planctonice, care se atenuează în apropierea iernii.

Iarna, dacă lacul eutrofic îngheață, apar modificări ce pot compromite existența unor organisme: stratul de gheață și de zăpadă împiedică pătrunderea luminii și reduc fotosinteza și șansele de oxigenare. Situația este agravată în cazul bazinelor acvatice cu volum mic, cu populații numeroase de microorganisme și a celor cu concentrații inițiale reduse de $O_2$ care este consumat în procese de descompunere.

Primăvara, circulația apelor omogenizează concentrația nutrienților în întreaga masă de apă și o îmbogățește cu $O_2$ din atmosferă (Benton și Werner Jr., 1974).

În mod normal, concentrația nutrienților în lacurile eutrofe nu este expusă la modificări rapide și permanente, fapt care le conferă — și lor — un anumit echilibru stabil.

*Microbiota lacurilor eutrofe.* Rheinheimer (1985) citează lucrarea lui Anagnostidis și Overbeck (1966), care descrie repartiția microbiotei în funcție de condițiile de mediu dintr-un lac eutrofic (lacul Pluss din Holstein) din care o igenul a dispărut complet din hipolimnion, fiind înlocuit de $H_2S$ (fig. 259)

Stratul superior al coloanei de apă (aproximativ 5 m) este populat de cianobacterii (în special, *Oscillatoria* sp.), care asigură productivitatea primară. Stratul imediat următor, situat sub termoclină, insuficient iluminat pentru dezvoltarea microorganismelor care fac fotosinteza oxigenică, este populat de bacteriile fototrofe purpurii și verzi (speciile dominante aparțin

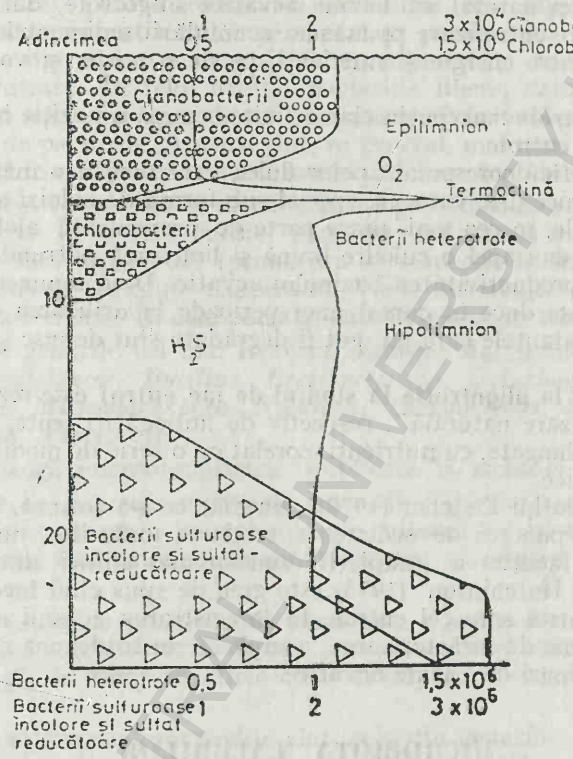



Fig. 259. — Distribuția verticală a diferitelor tipuri de bacterii într-un lac stratificat din regiuni temperate. Cianobacteriile sînt numeroase în epilimnion, iar bacteriile sulfat-reducătoare, în regiunea inferioară a hipolimnionului. Densitatea maximă a bacteriilor heterotrofe este situată sub zona maximă de fotosinteză și la interfața apă/sediment (după Rheinheimer, 1985, bazată pe datele lui Anagnostidis și Overbeck, 1966).

ord. *Chlorobiales)*. Ele folosesc $H_2S$ prezent în cantități importante în această zonă, ajungînd la densitatea de $1,5 \times 10^6$/ml. Zona de fund, anoxică și afotică, este populată de bacteriile sulfuroase incolore și sulfat-reducătoare. Bacteriile heterotrofe sînt prezente cu oscilații mari de densitate de-a lungul coloanei de apă, înregistrînd un nivel de densitate maximă la nivelul termoclinei ($1,5 \times 10^6$ bacterii proteolitice în special) și un al doilea la nivelul sedimentului de fund.

Termenul eutrof este adesea interpretat în sens restrictiv, în raport cu condițiile de poluare intensă.

Fletcher (1979) demonstrează că eutrofizarea poate fi un proces natural și o stare obișnuită în cazul unor lacuri cu o adîncime medie mai mică de 10 m, bogate în nutrienți anorganici, cu un conținut scăzut de $O_2$ hipolimnetic, cu o creștere abundentă de alge planctonice și mai ales de cianobacterii și o evoluție accelerată a procesului normal de succesiune (Reid și Wood, 1976).

Lacurile încep natural ca bazine acvatice oligotrofe, dar înaintează lent, progresiv, spre eutrofizare pe măsura acumulării sedimentelor și a creșterii raportului dintre energie și nutrienți, pe de o parte, și volumul apei, pe de alta.

**Apele mezotrofe** mai puțin clar definite, ocupă o poziție intermediară între oligotrofe și eutrofe.

**Apele distrofice** corespund apelor dulci, care conțin o mare cantitate de substanțe organice dizolvate, în special sub formă de coloizi și fragmente de țesuturi vegetale, în cea mai mare parte de proveniență alohtonă. Substanțele dizolvate dau apei o culoare brună și limitează pătrunderea luminii și, în consecință, productivitatea bazinului acvatic. Descompunerea substanțelor organice poate duce în cursul unor perioade la utilizarea completă de $O_2$ disponibil. Substanțele care nu pot fi degradate sînt depuse și acumulate în sedimente.

**Tranziția de la oligotrofie la stadiul de lac eutrof** este rezultatul unui proces de „eutrofizare naturală", respectiv de îmbogățiri lente, de-a lungul unei perioade îndelungate, cu nutrienți, corelat cu o serie de modificări fizico-chimice și biologice.

După expresia lui Fletcher (1979) „imediat ce s-a format, lacul începe să moară" prin depunerea de sedimente, erodarea malurilor, uneori pe distanțe mai mari, facilitarea „umplerii" zonelor mai adînci, diminuarea suprafeței etc. După Hutchinson (1973) este greu de spus cînd începe trecerea de la stadiul oligotrof spre cel eutrof. În înregistrarea acestui moment trebuie să se țină seama de caracterizarea complexă, nu totdeauna riguros exactă, a celor două tipuri de bazine acvatice.

## MICROBIOTA LACURILOR

**Lacurile cu apă dulce** au o microbiotă foarte diferită, care include, practic, toate categoriile de microorganisme: eubacterii, actinomicete, cianobacterii, microfungi, microalge și protozoare.

*Bacteriile* sînt în cea mai mare parte Gram-negative (85—95%), mobile, cu o morfologie foarte diferită (coci, bacili, vibrioni, spirili, filamente), izolate sau grupate în placarde, în formă de stea etc., cel mai adesea nesporulate. Numărul bacteriilor sporulate crește în lacurile mezotrofe și îl depășește pe cel al bacteriilor nesporulate în lacurile distrofice.

Brock (1966, 1974) consideră că majoritatea bacteriilor autohtone sînt asociate cu alte organisme, cu detritus sau cu diferite suporturi neanimate. Cele libere sînt în special alohtone, aflate „în drum" dintr-un loc în altul, apa jucînd, ca și aerul, un rol important în dispersarea microorganismelor. Circulația bacteriilor pe distanțe mici este asigurată de propria lor mobilitate, iar pe distanțe mari de curenți orizontali, verticali, de convecție etc.

Pomeroy (1980), sintetizînd atît datele publicate de Azam și Hodson (1977), ca și de Watson și colab. (1977), cît și rezultatele proprii, ajunge la

o concluzie complet diferită: numărul bacteriilor asociate cu particulele în mediile acvatice este mult mai mic decît cel al bacteriilor libere. Caracterul evasisteril al particulelor s-ar putea explica pe două căi: 1) organismele care se hrănesc prin filtrare (în special ciliatele) acționează atît de intens încît mențin aceste particule „curățate" de bacterii ca un cîmp bine recoltat; 2) cele mai multe particule ar fi inerte și, contrar datelor din literatură, nu prezintă avantaje pentru colonizarea bacteriilor. Avantajul rezultat din creșterea concentrației nutrienților pe suprafața particulelor este compensat de faptul că ele sînt mai ușor de găsit și de consumat de animalele care se hrănesc prin filtrare. În felul acesta, bacteriile libere, datorită dimensiunilor lor mici, pot scăpa mai ușor de a fi consumate. Ocazional pot fi găsite și bacterii legate de particule. Acestea sînt, în general, mai mari și au o morfologie mai regulată în comparație cu minibacteriile liber înotătoare.

Numărul bacteriilor și distribuția lor pe verticală înregistrează variații sezoniere mari. În lacurile curate, numărul este maxim în momentul producției maxime de fitoplancton (primăvara și respectiv la sfîrșitul verii și începutul toamnei în regiunile temperate). Vara, distribuția este influențată de stratificarea termală. În cele poluate, saprofitele cresc toamna și iarna.

Dintre genurile cel mai frecvent întîlnite sînt următoarele: *Achromobacter, Acinetobacter, Bacillus, Brevibacterium, Cytophaga, Flavobacterium, Micrococcus, Micromonospora, Nocardia, Pseudomonas, Sarcina, Spirillum, Streptomyces, Vibrio* etc.

Se adaugă microorganismele implicate în ciclurile N, S, Fe etc.

*Bacteriile fototrofe sulfuroase* purpurii *(Chromatiaceae)* și verzi *(Chlorobiaceae)* sînt prezente în regiunile din adîncul lacurilor, dacă acestea conțin $H_2S$ și sînt încă suficient iluminate pentru a asigura fotosinteza anoxigenică.

*Cianobacteriile* prezintă, de asemenea, o mare diversitate de specii și un număr mare în straturile de apă apropiate de suprafață. Unele au o răspîndire largă, în timp ce altele colonizează foarte selectiv numai anumite lacuri.

Cel mai frecvent răspîndite sînt cele din genurile: *Anabaena, Aphanizomenon, Ciclosphaerium, Gloeotrichia, Lyngbya, Microcystis, Phormidium.*

*Microfungii* prezintă, de asemenea, o mare diversitate. Speciilor autohtone li se adaugă fungii din sol *(Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. etc.), asociați cu materia organică străină, în special cu materialele vegetale în curs de descompunere. Unele specii tolerează variații mari de pH (1,9—3,2—9,6), altele se dezvoltă în condiții restrictive de pH acid sau alcalin.

Foarte mulți fungi sînt saprofiți. Cei mai frecvent întîlniți sînt fungii din grupul *Phycomycetes*, predominant acvatici, unicelulari sau miceliali, în cazul formelor mai evoluate. Se adaugă cei din grupurile *Ascomycetes* și *Deuteromycetes (Fungi imperfecti).*

Au fost descriși mulți fungi paraziți, ca, de exemplu, *Ancylistes closterium*, parazit pe alga *Closterium (Desmidiales)*, și *A. netrii*, parazit pe speciile de *Netrium* (Sparrow, 1960) (fig. 260).

Unii fungi *(Saprolegniales)* atacă diatomeele, iar alții au un habitat și un comportament mai puțin obișnuite. Astfel, *Zoophagus insidians* și *Z. tentaculatum* trăiesc fixați pe alge verzi filamentoase și se hrănesc cu roti-

fere, pe care le capturează cu ajutorul unor substanțe lipicioase sau al unor tentacule. Apoi pătrund în interiorul rotiferelor, pe cale bucală, unde se înmulțesc consumînd conținutul corpului.

*Levurile* sînt reprezentate de specii de *Candida, Cryptococcus, Rhodotorula, Torulopsis* etc.

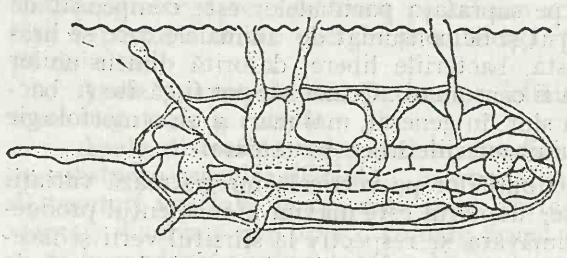


Fig. 260. — *Ancylistes netrii* parazitînd o algă verde unicelulară (*Netrium* sp.), cu conidiofori în diferite stadii de dezvoltare. Conidiile se ridică la suprafața apei (linia ondulată) (după Sparrow, 1960, modificat de Rheinheimer, 1985).

Rheinheimer (1985) adaugă listei microfungilor întîlniți frecvent în lacurile cu apă dulce numeroși *Fungi imperfecți*, care se dezvoltă pe resturi vegetale în curs de descompunere, între care: *Anguillospora elodeae, Alatospora* sp., *Dendrospora erecta-Heliscus longibrachiatus, Lemonniera agreatica, Margaritispora* sp. *Tricladium* sp., etc.

*Algele* reprezintă principalii producători primari din lacuri. Ele formează comunități diverse alcătuite din populații de *Chlorophyta, Bacillariophyta, Chrysophyta, Euglenophyta* și *Xanthophyta* (fig. 261) (Round, 1977).

*Protozoarele* au, în general, o dezvoltare corelată cu numărul bacteriilor. Dintre genurile cel mai frecvent întîlnite sînt de menționat: *Amoeba, Paramecium, Didinium, Stentor, Vorticella* etc.

**Lacurile sărate** sînt caracterizate printr-o salinitate foarte diferită, ajungînd, în cazurile extreme (Great Salt Lake din S.U.A.), pînă la o concentrație de 28% sau chiar pînă la saturare, cu formarea de precipitate de sare pe maluri, în regiunile cu evaporare mare, datorită temperaturii ridicate. Pot conține NaCl, $MgCl_2$, $NaHCO_3$, borax ($Na_2Br_4O_7$) sau $MgSO_4$ (lacurile „amare").

Ca orice mediu extrem, lacurile sărate sînt populate de un număr limitat de bacterii halotolerante și în special halofile (optimum de salinitate 20—30%), care conțin frecvent vacuole cu gaze ce le permit modificarea poziției pe verticala coloanei de apă, și pigmenți carotenoizi, cu rol protector față de intensitatea prea mare a luminii solare, care le colorează coloniile în roșu sau oranj strălucitor.

Între speciile cel mai frecvent întîlnite, Rheinheimer (1985) citează: *Halobacterium halobium, Halococcus morrhuae, Chromobacterium maris-mortui* etc. În lacurile sărate care conțin $H_2S$ au fost semnalate speciile: *Ectothiorhodospira halophila, E. halochloris* și tulpini halotolerante de *Chlorobium, Chromatium, Prosthecochloris, Pelodyction, Thiocapsa* etc.

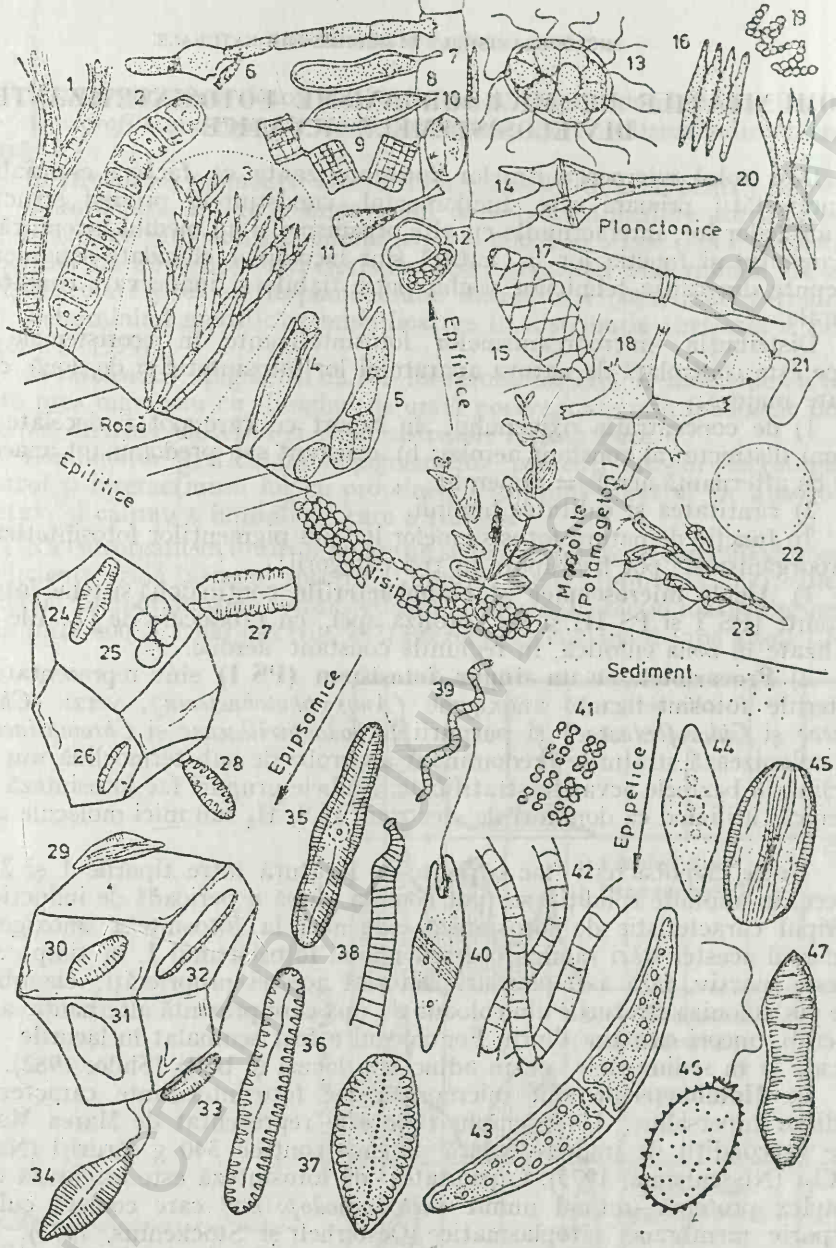



Fig. 261. — Cianobacterii și alge prezente în diferitele comunități de apă dulce (după Round 1977). **Epilitice: 1.** *Calothrix* (Cy). **2.** *Ulothrix* (Ch). **3.** *Chactophora* (Ch). **4.** *Chamaesiphon* (Cy). **5.** *Cymbella* (B). **Epifitice: 6.** *Oedogonium* (Ch). **7.** *Ophiocytium* (X). **8.** *Characium* (Ch). **9.** *Tabellaria* (B). **10.** *Cocconeis* (B). **11.** *Gomphonema* (B). **12.** *Dermocarpa* (Cy). **Planctonice: 13.** *Pandorina* (Ch). **14.** *Ceratium* (D). **15.** *Mallomonas* (Chry). **16.** *Fragilaria* (B). **17.** *Melosira* (B). **18.** *Staurastrum* (Ch). **19.** *Anabaena* (Cy). **20.** *Ankistrodesmus* (Ch). **21.** *Chlamydomonas* (Ch). **22.** *Coscinodiscus* (B). **23.** *Dinobryon* (Chry). **Epipsamice: 24.** *Navicula* (B). **25.** *Chlorella* (Ch). **26.** *Nitzschia* (B). **27.** *Opephora* (B). **28.** *Opephora* (B). **29.** *Amphora* (B). **30.** *Achnanthes* (B). **31.** *Achnanthes* (B). **32.** *Nitzschia* (B). **33.** *Amphora* (B). **34.** *Gomphonema* (B). **Epipelice: 35.** *Caloneis* (B). **36.** *Pinnularia* (B). **37.** *Surirella* (B). **38.** *Oscillatoria* (Cy). **39.** *Spirulina* (Cy). **40.** *Euglena* (E). **41.** *Merismopedia*. **42.** *Lyngbya* (Cy). **43.** *Closterium* (Ch). **44.** *Navicula* (B). **45.** *Amphora* (B). **46.** *Trachelomonas* (E). **47.** *Cymatopleura* (B).

Cheia abrevierilor: Cy — cianobacterii; CH — *Chlorophyta*; B — *Bacillariophyta*; Chry—*Chrysophyta*; E — *Euglenophyta*; X—*Xanthophyta* (pentru algele din mediul marin vezi fig. 270).

## COMUNITĂȚILE DE MICROORGANISME FOTOSINTETIZANTE DIN ECOSISTEMELE ACVATICE

Deși rolul microorganismelor fotosintetizante ca factori esențiali ai productivității primare este fundamental, cunoștințele privind structura comunităților lor, interacțiunile cu alte organisme și cu mediul înconjurător, randamentul și funcția lor în natură sînt incomplet elucidate sau inexact percepute din cauza tehnicilor vechi, puțin fiabile și inadecvate condițiilor naturale.

Distribuția microorganismelor fotosintetizante în ecosistemele acvatice este controlată de natura aparatului lor fotosintetic și de două coordonate majore:

1) de concentrația oxigenului, în raport cu care pot fi decelate trei regiuni distincte: a) constant aerobe; b) constant sau predominant anaerobe și c) cu alternanță aerob ⇄ anaerob;

2) cantitatea și calitatea luminii.

În funcție de natura fotosistemelor lor și a pigmenților fotosintetizanți, microorganismele pot fi grupate în trei categorii:

1) **Algele microscopice și cianobacteriile** conțin două sisteme fotosintetizante (PS I și PS II) și fac fotoliza apei, cu producere de $O_2$. Ele sînt localizate în zona eufotică, în regiunile constant aerobe.

2) **Procariotele cu un singur fotosistem (PS I)** sînt reprezentate de bacteriile fotosintetizante anoxigene *(Anoxyphotobacteria)*, verzi *(Chlorobiaceae* și *Chloroflexaceae)* și purpurii *(Rhodospirillaceae* și *Chromatiaceae)*. Ele colonizează straturile predominant anaerobe de sub termoclină sau chemoclină în bazinele acvatice stratificate. Ambele grupuri fac fotosinteză anoxigenică, utilizînd ca donatori de electroni, $H_2S$, $H_2$ sau mici molecule organice.

Unele cianobacterii fac o punte de legătură între tipurile 1 și 2, deoarece, în anumite condiții, se pot comuta, după o perioadă de inducție, de la tipul caracteristic de fotosinteză oxigenică la fotosinteza anoxigenică. În cursul acestei stări rămîne operant numai fotosistemul I, în timp ce PS II este inactiv, fără a fi pierdut. Datorită acestei proprietăți, cianobacteriile pot coloniza straturile din coloana de apă care prezintă alternanța aerob/anaerob, uneori cu ritm diurn. Fenomenul a fost semnalat în lacurile stratificate și în sedimentele puțin adînci din lacuri și bălți (Shilo, 1982).

3) **Halobacteriile** sînt microorganisme fotosintetizante caracteristice mediilor hipersaline. Un exemplu tipic este reprezentat de Marea Moartă, care în condiții de iradiere solară intensă conține 340 g săruri/l (NaCl și $MgCl_2$) (Nissenbaum, 1975). Capacitatea de fotosinteză este asigurată de un complex proteină—retinal numit *bacteriorhodopsină** care conferă culoarea purpurie membranei citoplasmatice (Oesterhelt și Stockenius, 1973). Halobacteriile utilizează energia luminoasă pentru a produce ATP sau gradient protonic.

### Poziția microorganismelor fotosintetizante în ecosistemele acvatice. Influența cantității și a calității luminii

Capacitatea microorganismelor fototrofe de a utiliza energia luminoasă depinde de lungimea de undă ($\lambda$) a radiațiilor disponibile, aceasta fiind determinată de natura pigmenților fotosintetizanți.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 187.

Microorganismele fotosintetizante au trei tipuri de pigmenți:

1) *clorofile* și respectiv bacterioclorofile, care utilizează direct energia solară;

2) *ficobiline*, pigmenți accesorii care absorb lumina pentru a o transfera clorofilelor. Ei au o importanță deosebită în mediile acvatice, deoarece în acestea intensitatea luminii (cu $\lambda > 600$ nm) scade rapid datorită fenomenelor de absorbție caracteristice apei, prezenței materialelor dizolvate sau particulate și chiar fitoplanctonului însuși, care poate mări turbiditatea apei, determinînd modificări semnificative în distribuția verticală a luminii (Fletcher, 1979);

3) *carotenoizi*, pigmenți cu rol fotoprotector față de radiațiile cu intensitate prea mare sau cu lungimi de undă nocive, care prin fenomene de oxidare pot distruge clorofila și chiar sistemele fotosintetice.

Combinația particulară a pigmenților prezenți într-un microorganism fototrof și interacțiunea lor cu proteinele determină spectrul de absorbție al acestuia și calitatea luminii pe care o folosesc.

Nici un organism fototrof nu are un sistem de pigmenți capabili să absoarbă cu eficiență egală întregul spectru al luminii solare. Împreună însă, diferitele tipuri de microorganisme fotosintetizante utilizează practic toate lungimile de undă între 400 și 1 100 nm (fig. 262) prezente în coloana de apă a zonei fotice.

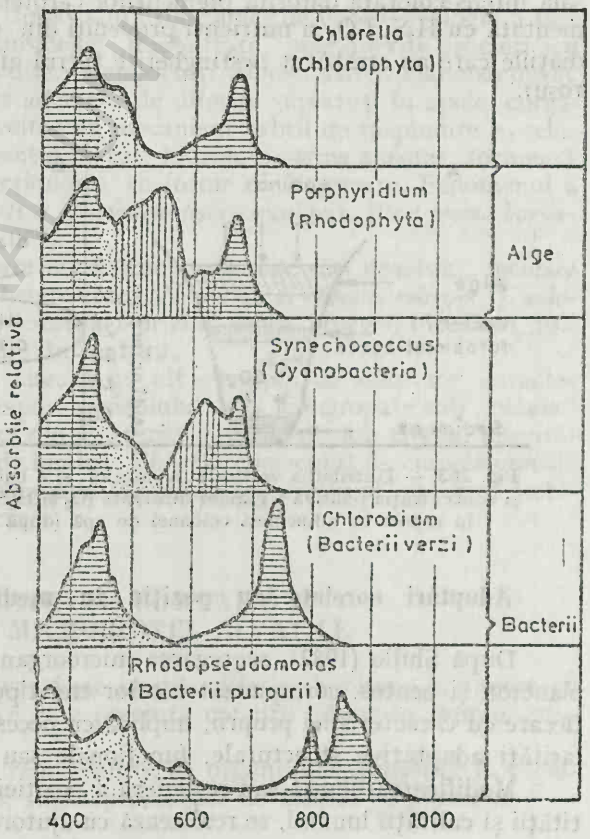



Fig. 262. — Reprezentarea schematică a spectrelor de absorbție ale principalelor microorganisme fotosintetizate, indicînd contribuția diferitelor clase de pigmenți fotosintetici: clorofile (linii orizontale); carotenoizi (regiuni punctate); ficobiline (linii verticale) lungimi de undă($\lambda$) = $\mu$m) (după Stanier și Cohen-Bazire, 1957).

În consecință, microorganismele fotosintetizante ocupă o poziție caracteristică în gradientul de radiații luminoase din mediile naturale în acord cu capacitatea lor de a sintetiza pigmenți de antenă, care absorb o anumită lungime de undă. Ele au capacitatea de a răspunde la modificările diurne, sezoniere sau sporadice ale gradientului de lumină prin modificarea cantității totale de pigmenți, prin modificarea numărului sau a mărimii centrilor fotosintetici sau prin reglarea selectivă a sintezei pigmenților specifici, ca în adaptarea cromatică (Shillo, 1982).

Rezultatul acestor proprietăți potențiale este efectul de „poziționare" prin care diferitele categorii de microorganisme fototrofe formează în zona eufotică a lacurilor, a lagunelor sau a oceanelor straturi suprapuse discrete, unele peste altele. Shillo (1982) citează, în acest sens, fenomenul descris de autorii germani sub denumirea de „Farbstreifen" prezent sub forma unor straturi succesive de diferite microorganisme fotosintetice.

Figura 263 prezintă într-o formă simplificată poziția microorganismelor fototrofe într-un lac meromictic permanent stratificat, în care circulația este limitată la straturile superioare, iar aerobioza este limitată la stratul superficial, în care se dezvoltă masiv algele și cianobacteriile. Sub adîncimea de 15—20 m, apa este permanent lipsită de $O_2$, permițînd dezvoltarea intensă și exclusivă a bacteriilor verzi și purpurii. Ele formează o „bandă" transversală intens colorată datorită pigmenților carotenoizi. În zona respectivă, alimentată cu $H_2S$, $CO_2$ și nutrienți proveniți din sediment, pătrund numai radiațiile care au străbătut nestingherite filtrul algal (roșu îndepărtat și infraroșu).

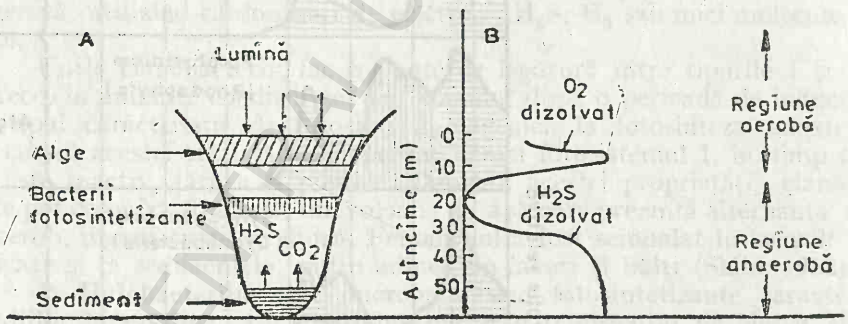



Fig. 263. — Distribuția verticală a algelor și a bacteriilor fotosintetizante (**A**) și concentrația relativă a gazelor dizolvate ($O_2$ și $H_2S$) (**B**), într-un lac meromictic în raport cu adîncimea coloanei de apă (după Stanier și colab., 1970).

## Adaptări corelate cu poziția în mediul acvatic

După Shillo (1982), segregarea microorganismelor acvatice ca neuston, plancton și bentos, corespunzător celor trei tipuri de medii în care trăiesc, fiecare cu caracteristici proprii, implică cu necesitate existența unor particularități adaptative structurale, funcționale sau biologice.

Modificarea diurnă sau sezonieră a poziției, ca răspuns la variația cantității și calității luminii, se realizează cu ajutorul mobilității active, frecvent

orientată datorită răspunsului de fototaxie sau fotofobie, sau schimbării densității de plutire în cazul bacteriilor ce conțin vacuole cu gaze *. „Umflarea" vacuolelor cu gaze din mediu determină ridicarea celulelor la suprafața apei, în timp ce turtirea lor determină coborîrea pe verticală. Ea este rezultatul creșterii densității și a presiunii de turgor ca rezultat al producerii și acumulării de fotosintat în celulă sau al acumulării de $K^+$ stimulată de lumina intensă.

Capacitatea de asociere a celulelor în zone în care concentrația nutrienților este mai mare (la interfața apă/aer în cazul neustonului sau la interfața apă/sediment sau apă/plante, animale sau particule de detritus) și unde aderența de suporturi solide este rezultatul unor modificări ale învelișurilor celulare. Microorganismele planctonice au învelișul de suprafață foarte hidrofil, în timp ce cele asociate sau aderente de diferite substraturi, cum sînt cele care formează neustonul și respectiv bentosul, au învelișuri foarte hidrofobe.

Expunerea microorganismelor bentonice la fluctuații mari de mediu la interfața apă/sediment privind concentrația $O_2$, a $H_2S$, valorile de pH și $E_h$ a creat condiții pentru colonizarea acestor regiuni cu microorganisme dotate cu o mare versatilitate metabolică, precum și cu organisme cum sînt cianobacteriile care au capacitatea de tranziție reversibilă de la fotosinteza oxigenică la cea anoxigenică.

O adaptare deosebit de importantă din punct de vedere ecologic a fost semnalată în cazul microorganismelor „imobilizate" prin diferite asocieri sau prin legare de sedimente sau diferite suporturi solide. Astfel, cianobacteriile din bentos, care trăiesc strîns aderente de diferite suporturi în apele curgătoare sau turbulente, au dezvoltat un mecanism subtil de răspîndire a celulelor progene în mediu: filamentul matur, hidrofob, strîns ancorat, formează hormogonii hidrofile care funcționează ca forme de dispersare. Fenomenul a fost descris la *Calothrix desertica*, *Anabaenopsis circularis*, *Plectonema boryanum* etc. (Rippka și colab., 1979).

În mod asemănător, toate organismele aderente din neuston, inclusiv algele, precum și bacteriile heterotrofe *(Nevskia, Hyphomicrobium, Caulobacter)* sau fototrofe *(Rhodomicrobium)* produc celule progene mobile („roitori"), ca forme de răspîndire în natură.

În sfîrșit, Shillo (1982) citează un alt exemplu de adaptare caracteristic fototrofelor bentonice, expuse pericolului de a fi îngropate sub „ploaia" de particule care sedimentează din straturile superioare, sub efectul gravitației și lipsite, în felul acesta, de lumină. El este reprezentat de cianobacteriile filamentoase, care rămîn totdeauna la suprafața sedimentului, datorită mobilității fototactice prin alunecare.

## HABITATE ȘI COMUNITĂȚI SPECIFICE MICROBIOTEI ACVATICE

Comunitățile de microorganisme ocupă diferite habitate în raport cu regiunile din bazinele acvatice care prezintă condiții adecvate pentru creșterea și multiplicarea lor.

Comunitățile limnetice, reprezentate de organismele prezente în regiunile din largul epilimnionului, sînt reprezentate de *neuston* și *plancton*.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 346.

**Neustonul** (gr. néuo = a aluneca).

Comunitate complexă, alcătuită din eubacterii, cianobacterii, alge, microfungi și protozoare, dezvoltată ca un monostrat sau ca un microstrat la interfața apă/aer, respectiv la interfața dintre hidrosferă și atmosferă. Este un habitat relativ puțin studiat, foarte aerat, intens luminat și supus la fluctuații rapide de temperatură. Pare să fie universal prezent, mai ales în mediile puțin expuse agitării.

Este alcătuit din *epineuston (supraneuston)*, respectiv din organisme care trăiesc în filmul de la suprafața apei, și din hiponeuston *(infraneuston)*, organisme care trăiesc imediat sub suprafață.

În apele stătătoare, formează un biofilm de suprafață reprezentînd un habitat ideal datorită luminii solare și prezenței $O_2$ și $CO_2$ din atmosferă.

La nivelul neustonului are loc o concentrare masivă de nutrienți minerali și organici (în special, lipide), datorită acumulării lor din masa acvatică și din aer din cauza tensiunii superficiale ridicate.

Numărul microorganismelor poate depăși de 100—500 de ori, și chiar mai mult, densitatea din coloana de apă inferioară. Pe lîngă organismele fotosintetizante (producători primari), se asociază numeroase bacterii heterotrofe și alți producători secundari.

Filmul de suprafață, neustonic, se comportă ca un substrat solid pe care se pot dezvolta numeroase bacterii (> cîteva milioane/cm²) aderente ca: *Hyphomicrobium, Nevskia ramosa* (probabil specifică acestui habitat), *Leptothrix, Caulobacter* etc. Bacterioneustonul mai conține celule de: *Achromobacter, Alcaligenes. Brevibacterium, Flavobacterium, Micrococcus, Pseudomonas, Sarcina* etc.

Cianobacteriile sînt reprezentate în principal de *Anabaena, Aphanizomenon* ș.a., iar *fungii* de diferite specii de levuri și de *Chladosporium*. După Rheinhart (1985), principalele genuri de *alge* prezente în neuston sînt: *Botrydiopsis, Chromulina, Navicula, Nautococcus, Platychrysis, Proterospongia, Sphacroea* etc.

*Protozoarele* sînt reprezentate, în special, de genurile *Acineta, Arcella, Codonosigna, Difflugia, Stylonychia* și *Vorticella*.

**Planctonul** (gr. „planktos" = care călătorește).

Este reprezentat de organisme incapabile să-și mențină poziția sau distribuția independent de mișcarea apei sau a aerului.

Este clasificat în funcție de dimensiuni ca: femto-, pico-, nano-, microplancton etc. și în raport de natura sa ca: virio-, bacterio-, mico-, fito- și zooplancton (fig. 264).

Planctonul are cea mai mare densitate în zona aerobă, în care în special fitoplanctonul se dezvoltă intens, datorită condițiilor favorabile de mediu, realizînd producția primară de materie organică a bazinului acvatic. El ocupă în mod deosebit coloana de apă situată la adîncimea de 20 la 50 cm, unde atît intensitatea luminii solare, cît și compoziția ei spectrală (respectiv lungimea de undă a radiațiilor corespunde condițiilor optime pentru fotosinteza algală).

Cianobacteriile *(Oscillatoria prolifica, O. agardhii, O. redkei, Lyngbya* etc.) preferă regiuni cu intensitate mai mică a luminii, multiplicîndu-se în număr mare la adîncimi mai mari (uneori chiar de 10—12 m) (Overbeck, 1972). Această poziție pare să fie determinată nu numai de complexul lor de

fotopigmenți, ci și de unii factori de mediu (temperatura, nutrienții proveniți din straturile inferioare etc.).

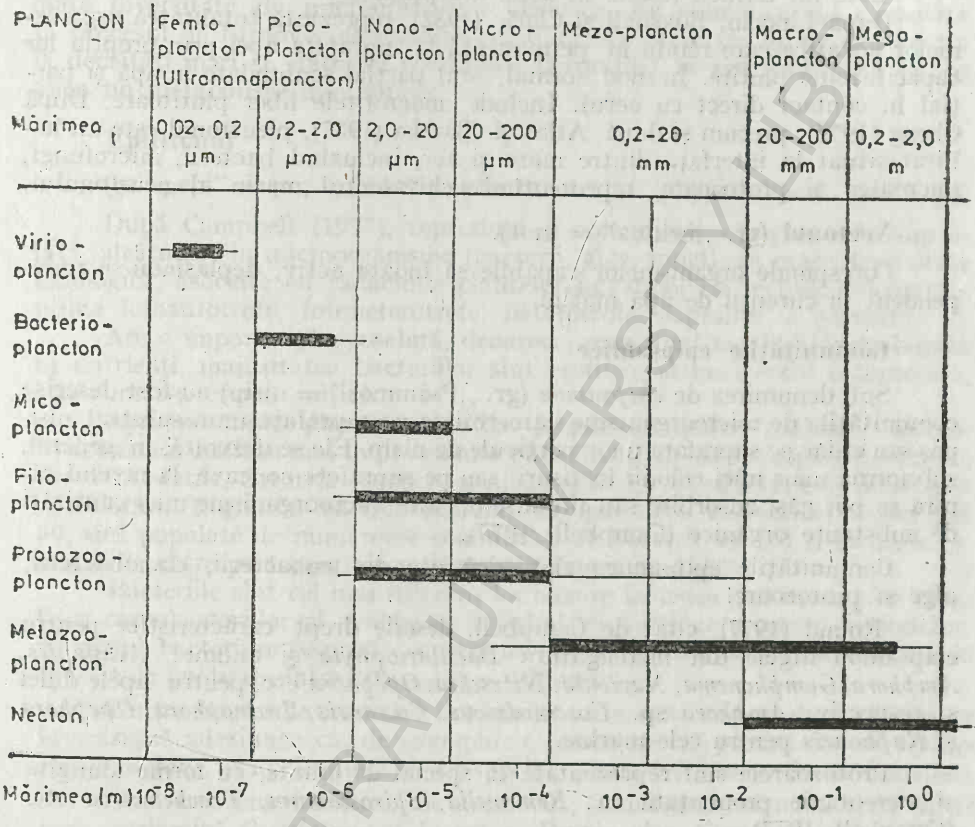



Fig. 264. — Clasificarea organismelor planctonice pe baza dimensiunilor lor (după Lincoln, Boxhall și Clark, 1982).

Datorită răspîndirii lor practic ubicvitare, microorganismele intră în diferite relații (de la simplu suport fizic la comensalism sau parazitism și patogenitate) cu alte tipuri de comunități de organisme acvatice.

**Bentosul** (gr. „benthos" = adîncul mării).

Este reprezentat de organisme atașate *de* sau trăind *în, pe* sau *aproape* de fundul rîurilor, al lacului sau al oceanelor, respectiv la interfața dintre hidrosferă și litosferă reprezentată de sedimente.

În mediul marin și în lacurile foarte adînci este localizat în regiuni în care pătrunde lumina, în așa fel încît fitoplanctonul consumă, prin respirație, mai multă hrană decît produce.

Sedimentul bentonic reprezintă un mediu foarte favorabil pentru dezvoltarea microorganismelor. Aerob la suprafață și progresiv anaerob în adîncime permite dezvoltarea masivă a producătorilor secundari, care folosesc compușii organici depuși din coloana de apă supraiacentă.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

**Pleustonul** (gr. „pleo" = a înota, a naviga).

Este un termen folosit în două accepțiuni.

După Lincoln, Boxshall și Clark (1982), reprezintă totalitatea organismelor acvatice care rămîn în permanență la suprafața apei prin propria lor capacitate de plutire. În mod normal, sînt parțial scufundate în apă și parțial în contact direct cu aerul. Include macrofitele liber plutitoare. După Cheng (1975), precum și după Atlas și Bartha (1987), pleustonul este un habitat situat la interfața dintre mare și aer, incluzînd bacterii, microfungi, microalge și protozoare, reprezentînd echivalentul marin al neustonului.

**Nectonul** (gr. „nektos" = înot).

Corespunde organismelor capabile să înoate activ, deplasîndu-se independent în curenții de apă marini.

### Comunitățile epipsamice

Sub denumirea de *epipsamon* (gr. „Psámmos" = nisip) au fost descrise comunitățile de microorganisme care trăiesc pe suprafața unui substrat nisipos sau chiar pe suprafața unor particule de nisip. Ele se dezvoltă, în general, sub forma unor mici colonii în fisuri sau pe suprafețe concave, la nivelul cărora se pot găsi adsorbite sau produse de alte microorganisme mici cantități de substanțe organice (Campbell, 1977).

Comunitățile epipsamice sînt alcătuite din eubacterii, cianobacterii, alge și protozoare.

Round (1977), citat de Campbell, descrie drept caracteristice pentru epipsamon algele din încrengătura *Bacillariophyta* și anume: *Achnantes, Amphora, Gomphonema, Navicula, Nitzschia, Opephora* etc. pentru apele dulci și respectiv: *Amphora* sp., *Coscinodiscus, Cocconeis, Licmophora, Opephora* și *Raphoneis* pentru cele marine.

Protozoarele sînt reprezentate în special de ciliate, cu forme alungite și stereotaxie pronunțată ca: *Remanella, Spirostomum, Trachelocerca* etc. (Campbell, 1977).

În apele dulci, comunitățile epipsamice evoluează cu un ritm sezonier, care implică prezența unui număr ($\geq 200 \times 10^8/m^2$) și a unei productivități maxime în lunile de primăvară (în special mai) și o densitate minimă în perioada septembrie — martie.

### Comunitățile epizoice

Sînt reprezentate de microorganisme dezvoltate pe suprafața organismelor animale, pe care formează, uneori, un strat gros, asemănător fulinguluide pe suprafața submersă a navelor.

Copepodele, viermii, crustaceele, peștii și chiar mamiferele acvatice sînt, practic, totdeauna, acoperite de un strat de microorganisme care colonizează total sau parțial suprafața corpului lor. Bacteriile pot forma comunități cu densități cuprinse între 1 000 și 10 000 celule/$cm^2$.

Comunitățile epizoice pot cuprinde microorganisme patogene, cu grade diferite de virulență. Cele mai cunoscute sînt cele care afectează peștii, producînd epizootii și pierderi mari economice datorită mortalității mari sau incapacității animalelor bolnave de a se apăra de prădători (Campbell, 1977).

### Comunitățile de microorganisme endozoice

Acestea trăiesc în intestinul animalelor acvatice și sînt alcătuite dintr-o mare diversitate de microorganisme acvatice. Au o importanță deosebită în procesul de turnover al materiei organice, deoarece ele ajung în intestin la densități mari și, datorită condițiilor favorabile, se pot multiplica și pot avea un metabolism mai rapid.

### Epifitonul

(gr. „epi" = pe; „fiton" = plantă de la „phynein" = a crește pe)

După Campbell (1977), reprezintă o comunitate complexă de suprafață, alcătuită din microorganisme (bacterii, alge, fungi), cu mare diversitate fiziologică, asociate cu rădăcinile plantelor acvatice. Ea include microorganisme fotoautotrofe, fotoheterotrofe, heterotrofe, saprofite și parazite.

Are o importanță deosebită, deoarece, exceptînd mediile foarte bogate în nutrienți, majoritatea bacteriilor sînt epifitice și nu efectiv planctonice, așa cum s-a crezut inițial.

Aproape toate plantele acvatice (algele bentonice, inclusiv macrofitele) au un epifiton mai mult sau mai puțin dens, cu excepția părților tinere, care sînt sterile, datorită reacției lor acide (pH 5,0) și eliberării de substanțe antibiotice. Regiunile bătrîne (bazale) ale plantelor respective, avînd pH 80, sînt populate de numeroase comunități de bacterii, ce pot fi utilizate ca hrană de către protozoare și rotifere (Rheinheimer, 1985).

Bacteriile sînt cel mai frecvent localizate în teaca gelatinoasă de înveliș a cianobacteriilor și a algelor, utilizînd ca nutrient mucusul pericelular. Numărul bacteriilor saprofite dezvoltate pe algele saprofite poate varia, în funcție de anotimp, între $10^4$ — $10^6$ și $10^9/cm^2$.

Dintre bacteriile acvatice predomină cele care dispun de structuri ce favorizează adeziunea ca, de exemplu: *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, *Sphaerotilus natans* în apele dulci și, în special, *Leucothrix mucor* în cele marine.

Sînt frecvent întîlnite, de asemenea, numeroase cianobacterii, între care predomină *Oscillatoria* și *Lyngbya*. Dintre alge, Campbell citează diatomeele (*Amphora*, *Achnantes*, *Gomphonema*, *Cymbella*, *Cocconeis* etc.) legate strîns de rădăcinile plantelor prin dispozitive adevărate de legare, precum și o serie de alge filamentoase ca *Oedogonium*, *Bulbochaete*, *Cladophora* purtînd, la rîndul lor, alte microorganisme epifite.

Unele alge marine mari (*Zostera marina* — iarba de mare) produc fotosintat (glucide, aminoacizi, acizi organici) pe care îl cedează bacteriilor și fungilor (*Labyrinthulales*) de pe suprafața lor.

Terminologia referitoare la comunitățile de organisme asociate cu suprafețele este destul de ambiguă. Rheinheimer (1985) descrie sub denumirea de *perifiton* comunitățile deosebit de complexe de organisme acvatice asociate cu detritus, aderente de diferite suporturi fizice vii (plante, animale) sau neanimate (roci, pietriș etc.), care formează pe suprafața acestora un înveliș, uneori dens, de suprafață.

Comunitățile de acest gen au fost descrise de autorii germani sub denumirea de *Aufwuchs* (germ. „auf" = pe, peste; „Wuchs" = creștere, vegetație). Perifitonul este adesea folosit ca hrană de numeroase animale acvatice.

După Lincoln, Boxhall și Clark (1982), perifitonul este o comunitate de plante, animale și detritus aderînd de pietre, plante și alte obiecte submerse, iar epifitonul ar fi o formă redusă și dispersată de perifiton.

### Epilitonul

Comunitățile de microorganisme epilitice sînt alcătuite din organisme care se dezvoltă pe suprafața rocilor sau a altor substraturi solide anorganice.

Sînt mai importante în zona litorală și nesemnificative sub zona fotică și în regiunile de fund, unde predomină sedimentele (mîl și nisipuri) diferite ca importanță și compoziție în specii. În funcție de particularitățile habitatelor, microorganismele din epiliton au, după Campbell (1977), caracteristici morfologice și fiziologice comune determinate de constrîngerile mediului acvatic.

În **izvoare**, ca și în **apele repede curgătoare**, epilitonul este reprezentat, în special, de producători primari asociați cu microorganisme aparținînd altor nivele trofice.

Dintre bacterii predomină cele ce se pot opune fluxului rapid al apei, prin ancorarea cu ajutorul unui „crampon" de suprafața pietrelor *(Caulobacter, Hyphomicrobium)* sau filamente de *Sphaerotilus natans)*. Ele se dezvoltă mai bine cînd sînt asociate cu algele, de la care pot prelua direct diferiți nutrienți.

Algele sînt reprezentate, de asemenea, de specii ca: *Lithoderma fluviatilis, Cocconeis placentula, Ulothrix* sau *Gomphonema*, care, prin natura lor, pot adera de roci, opunîndu-se curenților.

Studiul experimental al genezei epilitonului a demonstrat importanța esențială a formării unui biofilm bacterian inițial alcătuit din: *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Flavobacterium* sp., cărora li se adaugă ulterior: *Caulobacter* și *Hyphomicrobium* și, final, diatomee și protozoare ciliate. În ultima fază, acestui substrat i se pot adăuga alge macrofite ca, de exemplu, *Cladophora glomerata*.

Epilitonul dezvoltat pe pietrele de pe malul **lacurilor cu apă dulce** expus alternanței de umiditate și uscăciune, datorită fluctuației nivelului apei, este alcătuit din eubacterii, cianobacterii și diatomee, adesea inclavate în mucilagiul produs *in situ*.

Campbell (1977) citează o anumită zonare determinată de localizarea selectivă a unor specii de cianobacterii și de alge. Astfel, în regiunea superioară expusă unei uscăciuni maxime predomină: *Gloeocapsa* și *Scytonema*, mai aproape de apă *Nostoc* și *Calothrix*, apoi *Tolypothrix* și *Rivularia*, iar în regiunile submerse: *Spirogyra* și *Oedogonium (Chlorophyceae)*.

**Epilitonul marin**, dominat de algele brune și de alte forme macroscopice, este alcătuit, de asemenea, din eubacterii, cianobacterii, diatomee și alge verzi cocoide. Rocile de la malul stîncos, deosebit de neospitaliere, ca și zonele cu alternanță de umed/uscat, fluctuații mari ale temperaturii și concentrației sărurilor, sînt populate de cianobacterii *(Calothrix scopulorum, Glococapsa, Lyngbya* etc.), cele mai multe fixatoare de N (2,5 g $N/m^2$/an) (Campbell, 1977), și, uneori, de licheni din genul *Verrucaria*.

În sfîrșit, recifurile de corali prezintă o creștere epilitică intensă cu participarea cianobacteriilor *(Calothrix, Nostoc, Lyngbya* etc.), a algelor

roșii, care depun carbonat de calciu, sau care cimentează reciful și a diatomeelor. Se adaugă prezența și rolul important al dinoflagelatelor endosimbiotice (ca, de exemplu, *Gymnodinium* sp.), care, trăind în polipii coralilor, au un rol major în fotosinteza recifului (Campbell, 1977).

### Epipelonul

Este reprezentat de organismele acvatice care se deplasează pe suprafața sedimentelor sau care trăiesc la interfața dintre apă și sediment.

Numărul și activitatea lor variază foarte mult în raport cu particularitățile mediului natural și ating valorile maxime în mîlul lacurilor puțin adînci.

Campbell (1977) prezintă următoarele caracteristici ale microbiotei epipelice în concordanță cu diferite medii acvatice:

**Izvoarele** prezintă condiții de mediu uniforme datorită apei subterane și temperaturi de 9—10°C în regiunile temperate și oligotrofe în raport cu substanțele organice.

Microorganismele sînt rare și reprezentate în special de bacterii *(Gallionella* sp., *Leptothrix* sp., *Crenothrix* sp.). În izvoarele bogate în bicarbonați, carbonatul poate fi precipitat și depozitat pe măsură ce $CO_2$ este îndepărtat prin fotosinteză. În aceste cazuri se observă frecvent cianobacterii asociate cu crustele de carbonați. În unele cazuri, o algă macrofită *(Batrachospermum* sp.) este folosită ca sursă de nutrienți pentru microorganismele epifite.

*Izvoarele termale* au o microbiotă epipelică variabilă în funcție de compoziția lor chimică și de temperatură.

*Bacteriile* sînt reprezentate de *Leptothrix thermalis* (Fe), *Chloroflexus* (S) și de cianobacterii termofile ca: *Synechococcus lividus* și *Mastigocladus laminosus*. Campbell (1977) semnalează, de asemenea, prezența protozoarelor termofile ca: *Actinophrys sol, Cyclidium glaucoma, Hyalodiscus limax* și *Nassula elegans*.

**Riurile** conțin o microbiotă epipelică mai variată decît cea a izvoarelor, dominată în regiunile temperate de diatomee mobile și de unele alge flagelate ca: *Euglena* și *Phacus (Euglenophyta)*.

**Lacurile cu apă dulce.** Biota mîlului de apă dulce este reprezentată din bacterii (31%), alge (23%), protozoare (13%) și metazoare bentice (33%) (Campbell).

Numărul bacteriilor este maxim aproape de suprafața mîlului și scade repede cu adîncimea. În sedimentele lacurilor eutrofizate datorită bogăției în substanțe organice predomină actinomicetele *(Actinoplanes, Micromonospora, Streptomyces, Streptosporangium* etc.) și cianobacteriile *(Nostoc, Aphanothece* etc.).

*Fungii* sînt prezenți în număr foarte mic vara cînd hipolimnionul este dezoxigenat datorită stratificării. În regiunile apropiate de maluri predomină speciile cu proveniență terestră *(Achyla, Saprolegnia* și *Fungi Imperfecti)*. La suprafața sedimentelor aerobe se întîlnesc specii de *Clavariopsis, Tetracladium, Varicosporium* și *Candida aquaticum*.

*Algele epipelice* prezintă fluctuații numerice diurne (în raport cu gradul de iluminare), precum și „înfloriri" periodice sezoniere. Cel mai frecvent întîlnite sînt diatomee ca: *Frustulia rhomboides, Eucocconeis flexella, Eunotia* sp. alături de clorofite filamentoase *(Spirogyra, Zygnema* sp. etc.).

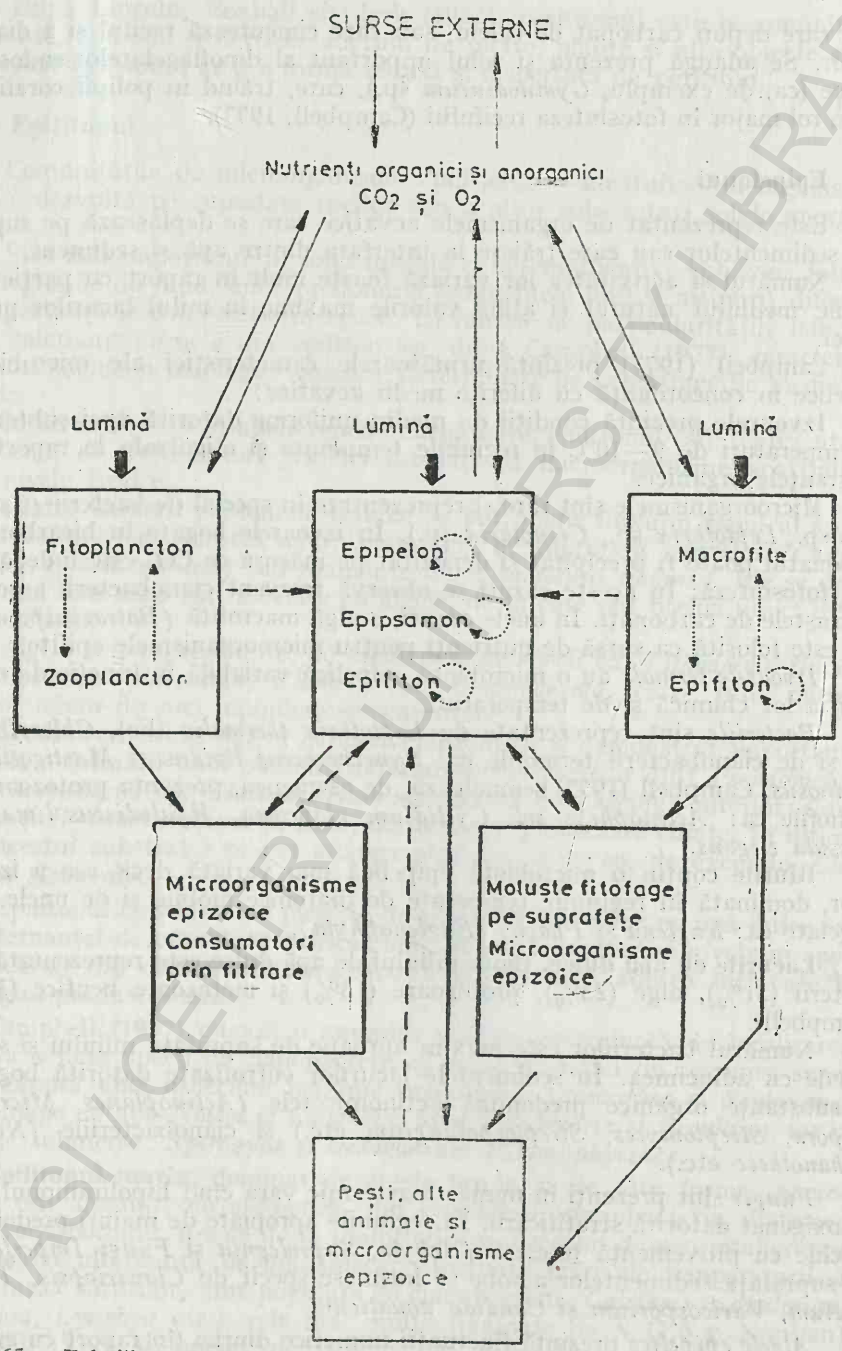



Fig. 265. — Relațiile comunităților de organisme și rețelele trofice din mediile acvatice. Săgețile punctate marchează circulația internă a nutrienților și lanțurilor trofice dintr-o comunitate; săgețile întrerupte indică transferul detritusului între comunități, iar cele continue transferul altor materiale și al energiei între comunități (după Campbell, 1977).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

**Oceanele** au o microbiotă epipelică în care predomină bacteriile Gram-negative *(Pseudomonas, Flavobacterium* etc.). Numărul lor ($10^4$ — $10^7$ g/mil umed) este mai mare la suprafață și scade rapid cu adîncimea. Speciile Gram-pozitive sînt limitate la cele din genul *Clostridium*. Bacteriile epipelice participă în recircularea nutrienților în sedimente și la suprafața lor.

*Protozoarele*, deși numeroase, egalînd adeseori ca biomasă bacteriile, sînt mai puțin active decît acestea (Campbell, 1977).

Figura 265 sintetizează relațiile dintre diferitele comunități de organisme și relațiile trofice din mediile acvatice.

## ACTIVITATEA MICROORGANISMELOR ÎN SEDIMENTELE ACVATICE

Sedimentele reprezintă unul dintre cele mai importante habitate pentru microbiota specifică, cu semnificație pentru economia generală a mediilor acvatice.

La formarea lor concură trei categorii de constituenți:

1) *Constituenții biogeni* prezenți, în funcție de adîncime, din excrețiile organismelor vii, din resturile derivate după moartea acestora, din molecule biogene „recalcitrante" la degradare sau din resturi scheletale ale macroorganismelor etc.

2) *Constituenții litogeni* reprezentați, în principal, din granulații minerale derivate din roci, soluri și cenuși vulcanice;

3) *Compușii hidrogenați* rezultați din reacții chimice anorganice produse în ape și/sau sedimente.

*Materiile organice* prezente în sediment, sub formă particulată sau dizolvată în apa liberă sau în spațiile interstițiale sedimentare, au o mare heterogenitate ca natură și origine.

Ele provin, în primul rînd, din secrețiile, excrețiile sau cadavrele diferitelor categorii de organisme din straturile acvatice supraiacente (fitoplancton, zooplancton, fitobentos, zoobentos etc.), care se depun mai mult sau mai puțin lent, în funcție de mărimea și densitatea lor, ca și de condițiile specifice de mediu. De menționat faptul că aceste materiale nu ajung în forma lor originară, deoarece suferă, în cursul depunerii lor, acțiunea de degradare exercitată de microorganismele din lac sau din mare.

În al doilea rînd, se adaugă aportul terigen de materie organică, a cărei contribuție este mai mare la țărm și în apropierea locului de deversare în rîuri, ce pot avea frecvent o încărcătură organică bogată, provenită din erodarea malurilor și a albiei, ca și din poluare.

Sedimentul reprezintă un mediu adecvat activității biologice a microorganismelor deoarece este permanent acoperit de apă și expus unor schimburi relativ ușoare, datorită migrării nutrienților și produșilor de metabolism în toate direcțiile.

În anumite condiții, respectiv la adîncimi mai mari de 300 m, sedimentul reprezintă un mediu relativ constant, izolat de influențele diurne sau sezoniere ale variațiilor de temperatură sau ale iluminării.

Pe baza activității și influenței microorganismelor la diferite nivele, determinate evident de condițiile de mediu, Delvèze (1964) propune zonarea sedimentelor în trei compartimente distincte:

1) **Interfața apă — sediment** corespunde unei regiuni de 5—20 cm, semisolidă sau semifluidă, apărută ca rezultat al unei sedimentări „actuale"

sau active. Ea conține resturi de organisme diferite (în funcție de adîncimea la care se găsesc), degradate după moartea acestora, precum și deșeurile lor formate în cursul vieții.

Stratul superficial este sediul activităților cele mai intense, deoarece are unele posibilități de oxigenare și condiții bune pentru degradarea bacteriană a moleculelor organice. Activitatea bacteriilor în sediment duce la apariția unor compuși din ce în ce mai refractari la degradare, realizînd o adevărată „humificare" a fundului mării sau a lacurilor adînci. La suprafață acționează microorganisme aerobe sau facultativ anaerobe, care sînt înlocuite progresiv, pînă la dispariție, în straturile profunde, de bacteriile obligat anaerobe.

Stratul de interfață este influențat de regimul apelor care îl acoperă și influențează, la rîndul său, direct evoluția straturilor inferioare. El poate fi, uneori, redus ca importanță sau în anumite condiții chiar absent și adeseori expus restructurărilor cînd suferă acțiunea mișcărilor violente determinate de curenții marini.

2) **Nivelul de sedimentare „recentă"**. După Delvèze (1964), termenul de „recent" folosit într-o accepție ecologică are sensul că acest strat este sau *este încă* sediul unor activități generale, determinate în special de microorganisme în perioade recente. Numărul eubacteriilor, al actinomicetelor și mai ales a fungilor este foarte mult diminuat. Predomină bacteriile anaerobe facultative și anaerobe obligate.

Stratul are o grosime variabilă și prezintă particularități foarte diferite, care țin de gradul de tasare, granulometrie, adîncime, circulația și activitățile biologice din straturile superioare (inclusiv din apa de mare), de viteza de depunere și de natura sedimentului mineral și organic etc.

3) **Nivelul sedimentelor „vechi"**, de regulă cel mai gros, depus pe stratul solid al fundului mării sau al oceanului este un habitat anoxic, propriu bacteriilor obligat anaerobe. Acestea sînt reduse numeric și ca diversitate. Posibilitatea unei degradări a conținutului organic și randamentul general al acesteia scad progresiv, proporțional cu adîncimea.

În ansamblu, din punct de vedere atît structural, cît și biologic, acest strat este caracterizat printr-o stabilizare în evoluția generală a sedimentului, expresie a unei activități biologice trecute.

**Microbiota sedimentelor** este formată din eubacterii, actinomicete și microfungi *(Phycomycetes, Fungi imperfecti)*. Activitatea lor este maximă pe suprafața sau în straturile superficiale ale sedimentelor, unde atît densitatea, cît și diversitatea lor sînt maxime. Ea are drept rezultat remineralizarea substanțelor organice. Numărul bacteriilor variază între cîteva sute de mii și miliarde/g de sediment. Aprecierile cantitative sînt însă destul de relative datorită faptului că majoritatea bacteriilor sînt adsorbite pe diferite particule.

ZoBell (1938) a demonstrat existența unei corelații între numărul bacteriilor și mărimea particulelor, în sensul că acesta este mult mai mic în sedimentele cu nisip grosier decît în cele fine (tabelul nr. 54).

În plus, pe măsură ce adîncimea apei crește, numărul bacteriilor saprofite și al fungilor inferiori scade. Explicația rezidă în faptul că drumul substanțelor organice care cad la fund este mai lung, o parte din ele sînt degradate pe parcursul sedimentării și, în consecință, condițiile nutriționale sînt mult mai puțin favorabile în sediment (Rheinheimer, 1985).

*Tabelul nr. 54*

**Relația dintre mărimea particulelor din sedimentele marine și numărul bacteriilor saprofite** (după ZoBell, 1938)

| Tipul de particule | Mărimea particulei ($\mu$m) | Conținutul în apă (%) | Numărul bacteriilor ($\times 10^3$/g) |
|---|---|---|---|
| Nisip | 50—1 000 | 33 | 22 |
| Praf („silt")* | 5—50 | 56 | 78 |
| Argile | 1—5 | 82 | 390 |
| Sediment coloidal | <1 | >98 | 1 510 |

* Praf („silt") după terminologia pedologică.

De asemenea, numărul microorganismelor este redus în cazul sedimentelor nisipoase perturbate permanent de curenții marini în care substanțele organice nu se pot acumula.

Deși numărul bacteriilor și al altor microorganisme este, în unele cazuri, deosebit de mare, în special, în sedimentele marine bogate în nutrienți organici, biomasa lor totală este relativ neînsemnată (tabelul nr. 55).

*Tabelul nr. 55*

**Numărul mediu și biomasa unor categorii de organisme per m² de sediment oceanic în primii 5 cm de la suprafață** (după ZoBell, 1963)

| Organisme | Numărul | Biomasa în grame (greutate umedă) |
|---|---|---|
| Macrobentos mare | 2,8 | 3,75 |
| Macrobentos mic | 230,0 | 3,30 |
| Meiobentos | $146 \times 10^3$ | 1,15 |
| Protozoare | $283 \times 10^6$ | 0,02 |
| Diatomee | $590 \times 10^6$ | 0,05 |
| Bacterii | $355 \times 10^9$ | 0,07 |

## EUTROFIZAREA

Utilizat, în prezent, în corelație cu fenomenele de poluare, termenul de *eutrofizare*, propus de Weber (1907), definește procesul de creștere rapidă a concentrației nutrienților (în special a azotului și fosforului) dintr-un bazin acvatic și menținerea la un nivel crescut perioade mai îndelungate de timp, în general, ca rezultat al unor activități umane. Cauzele poluării sînt multiple și includ: deversarea unor ape uzate orășenești neepurate (chiar tratate pentru îndepărtarea substanțelor organice) sau industriale, ape bogate în sulfați proveniți din detergenți, îngrășăminte agricole aplicate în exces (colectate de rîuri sau infiltrate în apele subterane), deșeuri de la marile creșcătorii industriale de animale, substanțe organice și minerale provenite din eroziunea solului etc. Campbell (1977) citează și unele cauze „naturale" ca, de exemplu, modificările dramatice ale vegetației, determinate de arderea

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lor sau cele locale produse de excrete, în coloniile de păsări marine sau adăposturi de animale.

Limitate inițial la lacuri, fenomenele de eutrofizare s-au extins la fluvii și chiar la unele mări semiînchise (Marea Neagră, Marea Mediterană).

Nu există criterii infailibile pentru a decela tendința evoluției spre eutrofizare.

Hutchinson (1973) admite drept cel mai simplu indicator al condițiilor nutriționale ale unui lac transparența și culoarea coloanei de apă, dar recomandă utilizarea lui cu prudență.

Vollenweider (1971), citat de Botnariuc și Vădineanu (1983), recomandă doi indicatori practici, respectiv concentrația P și a N, cu mențiunea că nu reprezintă teste de certitudine pentru pericolul de eutrofizare. El consideră ca nivel de alarmă depășirea concentrației de 10 mg P/m³ utilizabil sau 200—300 mg N anorganic/m³ în apele de primăvară sau dacă intrările acestor compuși într-un lac (raportate la suprafață) ating concentrația de 0,2—0,5 g P/m² și, respectiv, 5—10 N/m².

**Influențele asupra microbiotei acvatice.** Modificarea adesea bruscă și brutală a concentrației diferiților nutrienți, în special cu N și P, determină o perturbare profundă a ciclului trofic normal, cu repercusiuni asupra microorganismelor acvatice. După Campbell (1977), fosfații stimulează multiplicarea cianobacteriilor și a algelor verzi, iar asocierea N + P favorizează dezvoltarea în exces a bacteriilor, a algelor și a protozoarelor.

Dezvoltarea excesivă a microorganismelor fotosintetizante duce la „înfloriri" (engl. „Blooms"), care sînt urmate de consumul masiv al nutrienților disponibili. Moartea organismelor lipsite de nutrienți este urmată de eliberarea bruscă a unei mari cantități de constituenți celulari, care pot declanșa o nouă înflorire. La concentrații mari de nutrienți, populațiile de microorganisme sînt atît de dense încît devin ele însile limitante pentru dezvoltare. Biomasa microbiotei este mare, însă productivitatea per organism individual este mică. Apa devine tulbure, colorată și rău mirositoare și descompunerea masivă este asociată cu consumul de $O_2$, apariția anaerobiozei, care încetinește viteza de degradare și, frecvent, determină moartea animalelor din bazinul astfel modificat.

„Înfloririle" sînt manifestări ale eutrofizării determinate de creșterea explozivă a numărului cianobacteriilor sau al algelor într-o anumită regiune. Fenomenul poate apărea anual, sezonier sau sporadic în funcție de condiții. Ele pot afecta diferitele tipuri de bazine acvatice, inclusiv mările.

Factorii care amorsează „înfloririle", reglează mărimea și compoziția speciilor de microorganisme și controlează succesiunea lor sînt puțin cunoscuți.

**Înfloririle apelor dulci** pot fi produse de cianobacterii sau de diferite tipuri de alge, în funcție de condițiile de mediu.

**Cianobacteriile** sînt rare în lacurile oligotrofe. „Înfloririle" se produc în funcție de coordonatele geografice primăvara și toamna sau vara și sînt limitate inițial în stratul superficial al apei (1—2 m), dînd apei o culoare verzuie. În cazurile extreme pot invada întreg epilimnionul (Rheinheimer, 1985), (fig. 266).

Speciile cel mai frecvent implicate sînt: *Anabaena flos-aquae, Anabaenopsis* sp., *Aphanizomenon flos-aquae, Glocotrichia echinulata, Microcystis aeruginosa, M. flos-aquae, Oscillatoria rubescens, Synechococcus planeticus, S. parvula* etc.

„Înfloririle" produse de cianobacterii au o importanță negativă majoră datorită capacității lor de a sintetiza toxine puternice (Carmichael, 1981) și substanțe inhibitoare pentru dezvoltarea altor microorganisme. Toxicogeneza a fost observată prima dată în Australia, încă din anul 1878, după consumul apei dintr-un lac cu „înfloriri" cianobacteriene care au determinat moartea mai multor mii de oi.

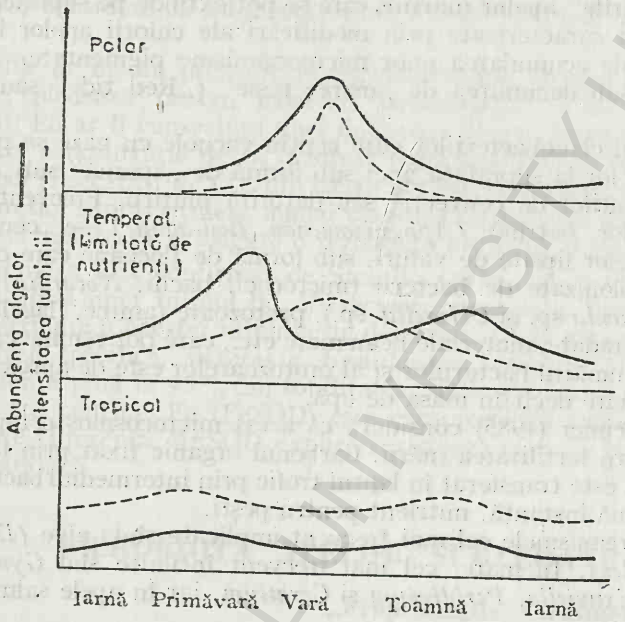



Fig. 266. — Diagramă ilustrînd posibilitățile de apariție a „înfloririlor" algale în funcție de climat. În regiunile polare, vara, ca rezultat al creșterii duratei zilei și al intensității iradierii solare. În regiunile temperate, primăvara sau vara timpurie, și un al doilea pic, mai mic, toamna, odată cu dispariția termoclinei, recircularea nutrienților și amestecul maselor de apă. În regiunile tropicale, variațiile sezoniere nu sînt atît de pronunțate. Pe fondul lor se înregistrează creșteri mici ale densității algelor primăvara și toamna (după Campbell, 1977).

Bishop (1959) a izolat de la *Microcystis aeruginosa* un polipeptid ciclic cu proprietăți endotoxice pentru șoarece, numit „factorul de moarte rapidă" FDF („Fast death factor"). Ulterior, Gorham și colab. (1964) au izolat de la *Anabaena flos-aquae* o toxină diferită, numită VFDF („Very fast death factor"), care produce moartea foarte rapidă a animalelor expuse acțiunii ei. A urmat descoperirea succesivă a unui număr mare de toxine de acest gen, active pe diferite categorii de animale acvatice sau terestre.

Un rol important pentru echilibrul microbiotei acvatice îl au diferitele substanțe de tip antibiotic produse de cianobacterii. Ele pot determina diminuarea bacterioplanctonului sau chiar dispariția algelor care se dezvoltau înainte de „înflorire". Un exemplu tipic este *muscorina*, antibiotic de tip dihidroxichinonic produs de *Nostoc muscorum*, activ pe bacterii, levuri și alge.

**„Înfloririle" algale ale apelor dulci** sînt mai rare și neasociate cu producerea de toxine.

Cel mai frecvent au fost izolate alge din genurile: *Chlamydomonas (Volvocales), Pediastrum, Scenedesmus (Chlorococcales), Dynobryon (Chrysophyceae), Asterionella* și *Melosira (Diatomee), Ceratium* și *Peridinium (Peridiniales)* și *Euglena (Euglenophyta).*

**„Înfloririle" apelor marine,** care se pot extinde pe suprafețe mari (uneori km²), sînt caracterizate prin modificări ale culorii apelor în roșu-brun, determinate de acumularea unor microorganisme pigmentate. Fenomenul a fost descris sub denumirea de „maree roșie" („Red tide" sau „Discolored water").

În cazul cianobacteriilor care conțin vacuole cu gaze se poate observa concentrarea lor la suprafața apei sub formă de „spumă" sub acțiunea vîntului, a curenților de convecție sau datorită plutirii. Frecvent, filamentele cianobacteriilor bătrîne *(Aphanizomenon flod-aquae)* se concentrează la suprafața apelor lipsite de valuri, sub formă de flocoane care conțin mii de filamente, colonizate de bacterii (micrococi, bacili, *Nocardia),* microfungi, alge (ca *Navicula* sp. și *Chlorella* sp.), protozoare (amibe, flagelate și ciliate), celule vii degradate, materiale neanimate etc., care pot rămîne ca atare cîteva săptămîni. Numărul bacteriilor și al protozoarelor este de aproximativ 10 000 de ori mai mare decît în masa de apă.

Rheinheimer (1985) consideră că acest microcosmos complex este important pentru fertilitatea mării. Carbonul organic fixat prin fotosinteză de cianobacterii este transferat în lanțul trofic prin intermediul bacteriilor, devenind, în ultimă instanță, nutrient pentru pești.

Microorganismele cel mai frecvent implicate sînt: alge *(Dinoflagellatae* și *Peridiniales).* În mare, cel mai frecvent întîlnite sînt *Gymnodinium* și *Gonyaulax, Exuviella, Peridinium* și *Ceratium,* iar în apele salmastre *Prymnesium parvum.*

În Marea Neagră „înfloririle" algale au fost determinate de *Exuviella cordata* și *Gonyaulax polygrama.* „Înfloririle" de acest tip au numeroase efecte nocive legate de scăderea concentrației de oxigen, dar mai ales, de producerea de toxine cu efecte nocive pentru animalele marine și chiar pentru om.

*Gonyaulax catenella* produce o toxină puternică ($DL_{50}$ pentru șoarece = 8 μg/kg), numită *saxitoxină* (deoarece a fost izolată inițial de la *Saxidomus giganteus).* Datorită acesteia, moluștele care se hrănesc cu microorganisme, prin filtrarea apei de mare, acumulează concentrații mari de saxitoxină și devin toxice pentru consum, determinînd intoxicații grave la om. De altfel, Sousa și Silva (1964) au stabilit o corelație directă între toxicitatea stridiilor dintr-o lagună și densitatea algelor *Gonyaulax* și *Gymnodinium.* În mod asemănător, toxina produsă de *Prymnesium saltans* este foarte toxică pentru pești, dar inofensivă pentru chironomide și crustacee, ceea ce demonstrează existența unui efect selectiv.

În zonele în care „înfloririle" sînt urmate de o distrugere masivă a celulelor algale, Hardy (1936) a observat diminuarea masivă sau chiar absența animalelor acvatice. După el, în aceste cazuri, fitoplanctonul exercită un efect de „excludere animală", realizat fie prin „faza" activă a celor din necton, fie prin moartea masivă a celor care nu se pot îndepărta rapid.

Fenomene similare „mareelor roșii" pot fi produse de unele cianobacterii *(Trichodesmium erythraeum),* de unele bacterii *(Thiobacteriales)* și mai rar de ciliate *(Cyclotrichium meunierii, Mesodinium pulex)* (Pourriot, 1966).

**Cauzele morții cianobacteriilor în cursul „înfloririlor".** Fenomenul suprimării cianobacteriilor în „înfloriri" este deosebit de important din punct de vedere practic, deoarece este adesea asociat cu eliberarea bruscă și masivă a constituenților intracelulari și cu apariția fenomenelor toxice (Shilo, 1973).

Datele de laborator pledează pentru intervenția cianofagilor și a unor bacterii — *Lysobacteria* — capabile să determine liza cianobacteriilor. Padan și Shilo (1973) consideră că rolul acestora în natură ar fi mai degrabă nesemnificativ.

Condițiile de mediu prezente în regiunile calde, în special tropicale și subtropicale, pledează pentru moartea fotooxidativă a comunităților de cianobacterii. Ea ar fi consecința unei iluminări foarte intense, într-un mediu cu o mare concentrație de $O_2$ dizolvat (suprasaturat) în straturile superioare ale apei și secătuit de $CO_2$ din cauza activității fotosintetice. În aceste condiții, teoretic, supraviețuiesc numai cianobacteriile care dispun de mecanisme speciale menite să le asigure o rezistență crescută la fotooxidare.

Fenomenul a fost confirmat de Steinitz (1976), în condițiile unui lac din Israel, asupra unei tulpini de *Microcystis marginata*. Rezistența foarte mare la fotooxidare a acestei tulpini este determinată de prezența unei superoxid dismutaze specifice, *superoxid dismutaza manganică* (MnSOD)*, care poate reprezenta pînă la 95% din totalitatea SOD. Prin contrast, superoxid dismutaza care conține Fe (FeSOD) este caracteristică tulpinilor sensibile la fotooxidare. Prezența MnSOD explică rezistența mare la $H_2O_2$ a celulelor lipsite de catalază.

## MICROBIOTA APELOR SUBTERANE

**„Proprietățile sedimentelor acvifere și ale apelor freatice determină capacitatea lor de a asigura viața microorganismelor și controlează abundența și activitatea acestora".**

W. C. Ghiorse
J. T. Wilson

Apele subterane rezultă din ploi și din topirea zăpezilor, precum și din apele din lacuri și rîuri, care se infiltrează prin solul afînat, acumulîndu-se deasupra unor straturi impermeabile.

Stratul în care sînt localizate este numit *strat purtător de apă subterană* („Groundwater carrier") sau acvifer, iar cel impermeabil, care împiedică difuzarea spre profunzime, asigurînd colectarea și acumularea, *strat barieră*.

În concepția clasică se consideră că pe măsură ce percolează de la suprafață spre pînza freatică, apa este debarasată, prin fenomene de adsorb-

---

* Superoxid dismutazele (SOD) sînt enzime cu rol protector, avînd capacitatea de a distruge în mod specific ionul $O_2^-$ (superoxid), derivat din $O_2$, în cursul reacțiilor biologice de reducere a $O_2$. Au rol de apărare față de toxicitatea $O_2^-$. Sînt prezente la toate microorganismele aerobe și absente la anaerobele obligate. Celulele procariote conțin în proporții variabile două SOD: MnSOD și FeSOD.

Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 95.

ție, de diferitele substanțe chimice reziduale și mai ales de microorganisme, fapt care îi asigură un înalt grad de puritate.

Perfecționarea metodelor de recoltare de la adîncime și a tehnicilor analitice au permis evidențierea în aceste ape a numeroase tipuri de microorganisme și de substanțe chimice reziduale din industrie, pesticide, îngrășăminte agricole etc. (Zoetman, 1985).

## Apele subterane ca habitat pentru microorganisme

Pe plan global, regiunile de sub suprafața terestră prezintă, probabil, o varietate infinită de tipuri de medii sedimentare, corespunzînd unei game largi de condiții geologice și geochimice. În acest cadru larg, fiecare localizare, fiecare strat prezintă anumite proprietăți fizico-chimice relativ constante, care determină, spre exemplu, dacă apa respectivă este potabilă sau nu.

Cele mai multe surse acvifere utilizate ca apă potabilă sînt situate la adîncimi variabile, de la cîțiva metri la zeci sau sute de metri. Ele sînt localizate, cel mai adesea, în straturi de nisip sau pietriș, în amestecuri de material aluvial neconsolidat, care permit un flux crescut al apei freatice în strate de gresie sau calcar (Ghiorse și Williams, 1989).

Apele freatice sînt oligotrofe datorită sărăcirii lor în substanțe organice prin fenomene de adsorbție și prin degradarea lor în cursul filtrării spre acvifer, de către populațiile de microorganisme indigene prezente la fiecare nivel. Ele conțin $< 1$ mg C organic/l dizolvat (DOC), cantitate care reprezintă un factor limitant pentru dezvoltarea microorganismelor.

Fac excepție apele de strat, care conțin țiței, și cele asociate zăcămintelor de cărbuni, care pot conține 2—10 mg DOC/l sau chiar mai mult.

Apele freatice de suprafață conțin C anorganic necesar microorganismelor autotrofe și heterotrofe.

Cele adînci sînt lipsite de $CO_2$, exceptînd cazul în care acesta este produs de microorganisme. Ele conțin sulfați (în special, în regiunile apropiate de suprafață) și concentrații mici de $NH_4^+$, $NO_3^-$ și fosfați.

Carbonul organic derivă din substanțele humice, acizii naftenici, compușii fenolici etc., proveniți în special din resturile vegetale de la suprafața solului.

Lipsa nutrienților, în special a surselor de C organic, dar și a celor de N și P reprezintă un factor limitant al abundenței microorganismelor în acvifere. Datorită aceluiași fapt, viteza de creștere și de multiplicare a bacteriilor este foarte lentă.

**Temperatura** la adîncimea de 10—20 m este constantă și corespunde mediei anuale a zonei geografice. Sub 20 m, ea crește cu 3°C la fiecare 100 m. În felul acesta, în acviferele situate la cîteva sute de metri, temperatura este ideală pentru microorganismele mezofile, iar la $\sim$ 1 000 m reprezintă limita inferioară pentru termofile, 50—55°C (Ghiorse și Williams, 1989).

**Presiunea hidrostatică** în acviferele de la 1 000 m este de 100 atm. deci compatibilă cu creșterea microorganismelor (ea crește cu 1 atm. la fiecare 10 m adîncime).

**Valorile de pH** sînt compatibile cu activitatea bacteriană și, în general, puțin variabile.

**Concentrația de săruri** crește, de asemenea, cu adîncimea și vîrsta * apei freatice, dar este de regulă de ordinul cîtorva sute de mg/l și nu afectează activitatea microorganismelor.

Fac excepție unele ape vechi din zone profunde ale acviferelor aluviale, care pot conține concentrații mari de săruri și metale toxice pentru microorganisme și unele surse cu condiții extreme (salacvifere), izolate hidrogeologic în care concentrația sărurilor dizolvate poate ajunge la 20%.

**Microbiota acviferelor.** Datele privind natura și numărul microorganismelor prezente în apele freatice, de o importanță fundamentală pentru stabilirea caracterului lor potabil, sînt foarte reduse, datorită dificultăților de forare și recoltare în condiții care asigură evitarea contaminării.

În ultimii ani, tehnicilor uzuale de numărare directă la microscop **, concentrare și cultivare *in vitro* li s-au adăugat tehnici mai rafinate ca, de exemplu, utilizarea unor markeri moleculari (ATP, fosfolipide, acid muramic etc.), radioizotopi etc.

Determinările au evidențiat prezența microorganismelor (bacterii, microfungi, protozoare) nu numai în zonele superficiale, ci și în sedimentele acvifere nisipoase și în apa freatică.

Numărul lor variază în limite foarte largi, în funcție de starea trofică a zonei, dar este corelat cu adîncimea, în sensul diminuării progresive paralel cu pătrunderea în straturile mai profunde.

Este maxim în cazul surselor poluate cu C și N.

Valorile furnizate de diferiți cercetători oscilează, în mod „normal", între un număr total de bacterii de $10^5$ — $10^8$/g și $10^2$ — $10^7$/g bacterii viabile la 35 m (Towler și colab., 1985) și respectiv $10^4$ — $10^8$ bacterii (număr total) și $10^3$ — $10^6$/g (bacterii viabile). În probele recoltate de la adîncimi cuprinse între 14 și 182 m (Chapelle și colab., 1987).

Olson și colab. (1981) au evidențiat prezența bacteriilor sulfat-reducătoare la adîncimea de 1 264—1 752 m.

Dintre bacterii, cel mai frecvent au fost evidențiate *Achromobacter, Flavobacterium, Micrococcus, Nocardia* etc.

Hirsch și Rades-Rohkohl (1983), citați de Rheinheimer (1985), au evidențiat într-o apă freatică din regiunea Holstein, 10 specii de protozoare, 8 de microfungi și 72 tipuri de bacterii, dintre care au identificat următoarele genuri: *Microcyclus, Hyphomicrobium, Planctomyces, Prosthecomicrobium, Gallionella, Caulobacter, Agrobacterium, Clostridium, Nocardia.*

Ele includ bacterii anaerobe facultative și obligate, heterotrofe, sulfat-reducătoare, denitrificatoare, ferobacterii, metanogeni etc.

## Factorii care influențează prezența microorganismelor în apele freatice

Prezența și densitatea microorganismelor în acvifere sînt influențate de o serie de factori hidrogeochimici și de fenomene de suprafață:

Textura, porozitatea și permeabilitatea materialelor de sub suprafața terestră afectează disponibilitatea apei și determină apariția și dimensiunile

---

* După Ghiorse și Williams (1989) o fîntînă domestică, avînd adîncimea de 6 m furnizează apă reîncărcată cu peste un deceniu mai înainte.

** Limita cea mai joasă de detectare a bacteriilor prin microscopie directă, într-un mediu lichid, fără concentrare prealabilă (prin centrifugare, filtrare etc), este de $10^6$ — $10^7$ bacterii/ml.

spațiilor poroase, care la rîndul lor limitează mărimea și tipurile de microorganisme prezente.

Mărimea spațiilor interstițiale individuale variază în limite foarte largi de la pori cu dimensiuni microscopice la fisuri fine, crăpături mai largi și mari soluții de continuitate (McNabb și Dunlap, 1975).

După Ghiorse și Williams (1989), spațiile cu mărimi între 0,1—1 μm pot adăposti bacterii*, în timp ce cele mai mari (1—10 μm) permit localizarea microorganismelor eucariote și a formelor lor de rezistență.

Pe baza acestor date, sedimentele acvifere pot adăposti, pe lîngă bacterii, la fel de bine, microorganisme eucariote (microfungi, protozoare), în timp ce organismele mai mari sînt excluse (exceptînd acviferele cu pietriș și cele din peșteri).

*Rolul fenomenelor de adsorbție.* Regiunile cu suprafețe solide, caracteristice zonelor înalt structurate pot influența activitatea microorganismelor prin adsorbția nutrienților, enzimelor extracelulare și chiar a microorganismelor. Avantajele decurgînd, teoretic, din acest fenomen sînt multiple:

— În mediile oligotrofe adsorbția pe diferite suprafețe reprezintă un habitat favorizant pentru bacteriile aderente față de cele libere, deoarece ele sînt expuse la o aprovizionare constantă cu nutrienți, proveniți din apa care percolează pe suprafața lor (Bouwer și Mc Carty, 1984).

— Bacteriile aderente dispun de mai mulți ioni utili ($NO_3^-$, $PO_3^{2-}$, $NH_4^+$) decît cele dispersate.

— Imobilizarea bacteriilor favorizează adsorbția și acumularea macromoleculelor ce pot fi utilizate de celulele aderente prin acțiunea hidrolazelor lor extracelulare și furnizarea de nutrienți.

— Formarea de polimeri extracelulari de către bacteriile aderente favorizează acumularea de nutrienți. Fac excepție straturile groase de depozite polizaharidice care pot acționa ca bariere, întîrziind difuziunea nutrienților și a produșilor de uzură.

— Adsorbția favorizează formarea de consorții (asocieri) de microorganisme diferite, între care apar interacțiuni cooperante nutriționale sau ducînd la degradarea unor polimeri insolubili etc.

— Conferă protecție față de diferiți factori negativi abiotici (toxine, pH suboptimal) sau biotici (prădători).

## Migrarea microorganismelor în acvifere

Mecanismele fizice și biologice care controlează migrarea microorganismelor în apele subterane nu sînt cunoscute. Este probabil că pe lîngă mobilitatea proprie și de chimiotaxie intervine însăși mobilitatea apei din sediment.

Harvey și colab. (1984) au demonstrat posibilitatea transportului lateral în acviferele nisipoase la 2—3 km de punctul de contaminare, determinînd contaminarea unor zone extinse.

Fenomenul a fost confirmat de Roberts și colab. (1986) cu ocazia unor studii ce vizau explicarea mecanismului dispariției contaminanților organici după o perioadă de timp de la pătrunderea lor în acvifer. Ei au realizat

* Deși cele mai multe bacterii cultivate în laborator au mărimi $> 1{,}0$ μm, formele de supraviețuire în subteran pot avea numai cîteva zecimi de μm diametru. Ele revin la diametrul normal, după cultivare *in vitro*, în prezența nutrienților.

o contaminare artificială cu clor, că trasor pentru apă, tetracloretilenă (substanță nedegradabilă biologic) și 1,2-diclorbenzen, urmărind circulația orizontală, de-a lungul unor puncte de control. Au demonstrat de asemenea că primul marker care ajunge la punctul de control este clorul. El poate fi decelat o perioadă de timp, după care concentrația lui scade brusc (fig. 267 și 268). Urmează tetracloretilena a cărei concentrație scade mai lent.

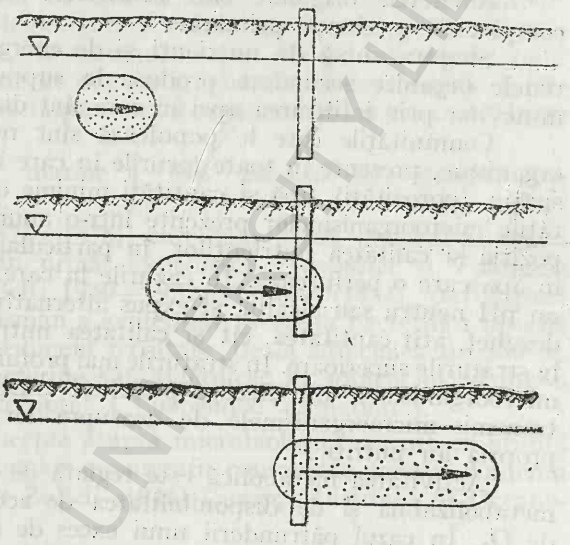


Fig. 267. — Reprezentarea schematică a posibilității de studiere a fluxului unei ape freatice cu ajutorul unui marker de poluare artificial, a cărui deplasare este urmărită într-o serie de situsuri monitorizate (după Roberts și colab., 1986).

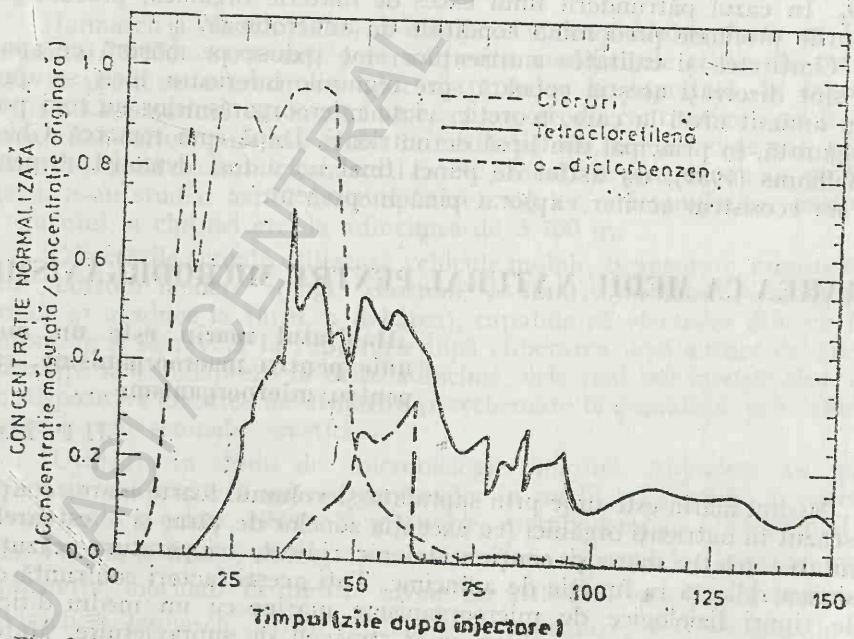



Fig. 268. — Reprezentarea schematică a succesiunii apariției a trei componenți din compoziția markerului de poluare într-un anumit situs din acvifer (după Roberts și colab., 1986).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ultimul poluant care ajunge la punctul de control este 1,2-diclorbenzenul, care după ~ o lună dispare brusc, fiind probabil metabolizat activ de microorganismele care s-au adaptat la prezența lui.

## APELE SUBTERANE CA ECOSISTEM

Acviferele originare sînt ecosisteme unice, în sensul că sînt lipsite complet de producție primară.

Singura sursă de nutrienți și de energie este reprezentată de materialele organice secundare produse la suprafața mediului, și transportate în acvifer prin infiltrarea apei în care sînt dizolvate.

Comunitățile care le populează sînt reprezentate exclusiv de microorganisme, prezente în toate locurile în care întîlnesc trei condiții esențiale: spațiu (porozități), apă și cantități minime de nutrienți. Natura și proprietățile microorganismelor prezente într-o anumită localizare depind de compoziția și calitatea nutrienților, în particular a materiei organice dizolvate în apa care o perfuzează. În cazurile în care solul este foarte productiv, cu un pH neutru sau alcalin, și expus alternativ la uscare/umezire sau îngheț/dezgheț, atît cantitatea, cît și calitatea nutrienților pot fi mari, mai ales în straturile superioare. În straturile mai profunde, situația este foarte variată: microorganismele din fiecare punct al traseului apei primesc ceea ce le-a transmis microorganismele de deasupra lor și extrag cele necesare pentru propria lor nutriție.

Activitatea metabolică este reglată de cantitatea de materie organică metabolizabilă și de disponibilitatea de acceptori de electroni, în special de $O_2$. În cazul pătrunderii unui exces de materie organică, precum și în straturile profunde predomină condițiile de anaerobioză.

Cantitatea și calitatea nutrienților sînt reduse pe măsură ce apa în care sînt dizolvați aceștia coboară spre regiunile inferioare, încît se ajunge la un anumit nivel la care, teoretic, viața microorganismelor nu mai poate fi asigurată, în principal din lipsă de nutrienți. După cum remarcă Ghiorse și Williams (1989), un astfel de punct final nu a fost demonstrat pentru nici un ecosistem acvifer explorat pînă în prezent.

## MAREA CA MEDIU NATURAL PENTRU MICROORGANISME

**„Habitatul marin este un mediu unic pentru macroorganisme, ca și pentru microorganisme..."**

J. P. Isaacs

Mediul marin este unic prin suprafața și volumul foarte mare, conținutul scăzut în nutrienți organici (cu excepția zonelor de țărm și a estuarelor), salinitatea relativ mare și conținutul ionic ridicat, temperatura scăzută și presiunea ridicată în funcție de adîncime. Toți acești factori confruntă diferitele tipuri fiziologice de microorganisme marine cu un mediu dificil și necesită, din partea lor, evoluția unor strategii de supraviețuire. Mareele, curenții oceanici, convergența și divergența maselor de apă reprezintă deopotrivă factori importanți pentru microorganismele marine.

Mediul marin ocupă 70,8% din suprafața planetei. Aproximativ 97,6% din volumul total al apei de mare este reprezentat de oceane și 88% are adîncimea de peste 1 000 m.

Luînd în considerație faptul că apa de mare permite viața la toate adîncimile și presupunînd, convențional, o grosime de 38 m a biosferei continentale, Jannasch și Taylor (1984) apreciază că 90—99% din întreaga biosferă a planetei este asociată cu apa de mare. Aceste date sînt importante din punct de vedere ecologic, ținînd seama de stratul „subțire" productiv al biosferei continentale, de volumul enorm de apă adîncă, de rolul primordial al microorganismelor în circulația globală biogeochimică a elementelor, de adaptările extreme impuse microorganismelor și de constrîngerile specifice mediului oceanic.

Progresul microbiologiei marine a fost asigurat de perfecționarea tehnicilor de explorare rapidă.

Expediției *Challenger* (1873—1876), care marchează debutul biologiei adîncului mării ca știință, i-au urmat expedițiile *Travaillier* și *Talisman* (1882—1883) și *Galathea* (ZoBell, 1950—1952). Certes (1884), participant la expedițiile Travaillier și Talisman a evidențiat prezența bacteriilor practic în toate probele de apă și de sediment recoltate de la adîncimea de 500 m. El a ajuns la concluzia că bacteriile supraviețuiesc în adîncul mării într-o stare de asfixie, de „viață întreruptă" („Suspended animation").

Cristalizarea primelor concepte asupra microbiologiei marine ca știință a fost marcată de apariția primelor monografii consacrate acestui domeniu publicate de Benecke (1933) și ZoBell (1946) (Scripps Institute of Oceanography).

Jannasch și Wirsch (1973) au inaugurat epoca studiilor *in situ* pe fundul oceanului (3 700—6 000 m), pentru a evita modificările critice de temperatură și presiune consecutive aducerii probelor la suprafață, în laborator. Utilizînd submarinul Alvin au fost efectuate studii cantitative prin însămînțarea unor culturi pure sau mixte în medii lichide, conținînd acetat, glucoză, manitol și acizi cazaminici, marcați cu $^{14}C$, încubate pînă la un an pe fundul mării. S-au studiat astfel descompunerea algelor, a lemnului, a amidonului, a agarului, a chitinei etc. la adîncimea de 3 700 m.

Cercetările actuale utilizează vehicule mobile, neancorate, numite *tripode* sau „bottom landers" (engl. „bottom" = fund; „to land" = a ajunge, a prinde și a aduce la țărm, a debarca), capabile să efectueze diferite funcții automate și să revină la suprafață după eliberarea unei ancore de greutate. Capabile să se adapteze la orice adîncime, cele mai noi modele sînt dotate cu dispozitive acustice de urmărire și rechemare la suprafață, prin eliberarea ancorei prin semnale acustice.

Utilizate în studii de microbiologie marină, tripodele au permis: 1) măsurarea creșterii microorganismelor în medii cu peptonă și extract de levuri (Seki și colab., 1974); 2) măsurarea metabolismului microbian al nitraților (Wada și colab, 1975); 3) transformarea substratelor organice marcate radioactiv, inoculate la diferite nivele ale stratului superior al sedimentelor (Wirsen și Jannasch, 1976), precum și 4) capturarea amfipodelor din adînc, studiul comparativ al metabolizării hranei solide, marcată radioactiv în țesuturi sau sub acțiunea microbiotei lor intestinale.

## Zonarea ecologică a mediului marin

Propusă inițial de Hedgpeth (1957), clasificarea mediului marin a suferit o serie de remanieri și completări, care au permis caracterizarea diferitelor regiuni populate de microorganisme.

Figura 269 prezintă o variantă revizuită și actualizată a acestei clasificări (Lincoln, Boxhall și Clark; 1982). Deși nu este acceptată unanim, ea are avantajul de a prezenta detaliat limitele și subdiviziunile mediului oceanic. Ea împarte convențional mediul marin în domenii, zone și subzone (unele cu statut incert) pe baza a două criterii majore: adîncimea și mediul bentic (fundul mării), după cum urmează:

1) Coloana de apă este divizată în domeniile *neritic* (cu adîncime mai mică de 200 m) și *oceanic* sau pelagic (de la marginea platformei continentale în larg).

2) Regiunea de fund (bentică) este divizată, indiferent de natura zonei de deasupra (rocă sau apă), în zonele: *litorală, sublitorală, batială, abisală* și *hadală*.

Zonarea permite studiul mării raportat la două medii majore: mediul pelagic (largul mării) și mediul bentic (fundul mării).

**Domeniul neritic** (gr. „Nerites" = cochilie marină) corespunde zonei marine de mică adîncime situată deasupra platformei continentale. Microbiota respectivă este dominată de microalge, microorganisme chimioautotrofe și heterotrofe, aerobe și facultativ anaerobe.

**Domeniul oceanic** corespunde coloanei de apă situată în largul mării, dincolo de platforma continentală.

**Diviziunea pelagică** (gr. „Pelagos" = mare) definește zona de larg a mării sau, după unii autori, totalitatea apelor mării. Ea include, în funcție de adîncime, zonele *epipelagică* (0—200 m), *mezopelagică* (200—1 000 m) și *batipelagică* (1 000—4 000 m), *abisopelagică* și *hadopelagică*.

**Domeniul litoral** este regiunea de acțiune predominantă a microorganismelor din sol și a fenomenelor de eroziune, spălare și solubilizare a substanțelor minerale și de transport în mare. Reprezintă interfața dintre ecosfera marină și litosferă. Partea corespunzătoare țărmului este expusă la perioade alternative de umiditate și uscăciune, care sînt maxime în cazul mareelor. Domeniul litoral este divizat în zonele litorală și sublitorală. La rîndul său, zona litorală cuprinde subzonele supralitorală și eulitorală.

**Zona sublitorală** se întinde de la limita inferioară, cea mai joasă a zonei litorale, pînă la marginea platformei continentale. Este subdivizată într-o subzonă *infralitorală* și alta *circalitorală*.

**Zona batială** (gr. „Bathos" = adînc) aparține regiunii de fund a oceanului, între adîncimile de 200 și 4 000 m. Include panta continentală în care adîncimea scade rapid.

**Zona abisală** (gr. „Abissos" = fără fund), situată între 4 000 și 6 000 m, include zonele de activitate microbiochimică (formare de „noduli" de Mn) și geochimică. Este divizată în *cîmpia abisală* și *zona abisopelagică*.

**Zona hadală** (de la Hades, zeul infernului în mitologia greacă) sau ultraabisală include apele mai adînci de 6 000 m, corespunzătoare „tranșeelor" profunde și canioanelor zonei abisale.

*Adîncimea* medie a oceanelor derivă din împărțirea volumului total la suprafața totală și este de 3 800 m.

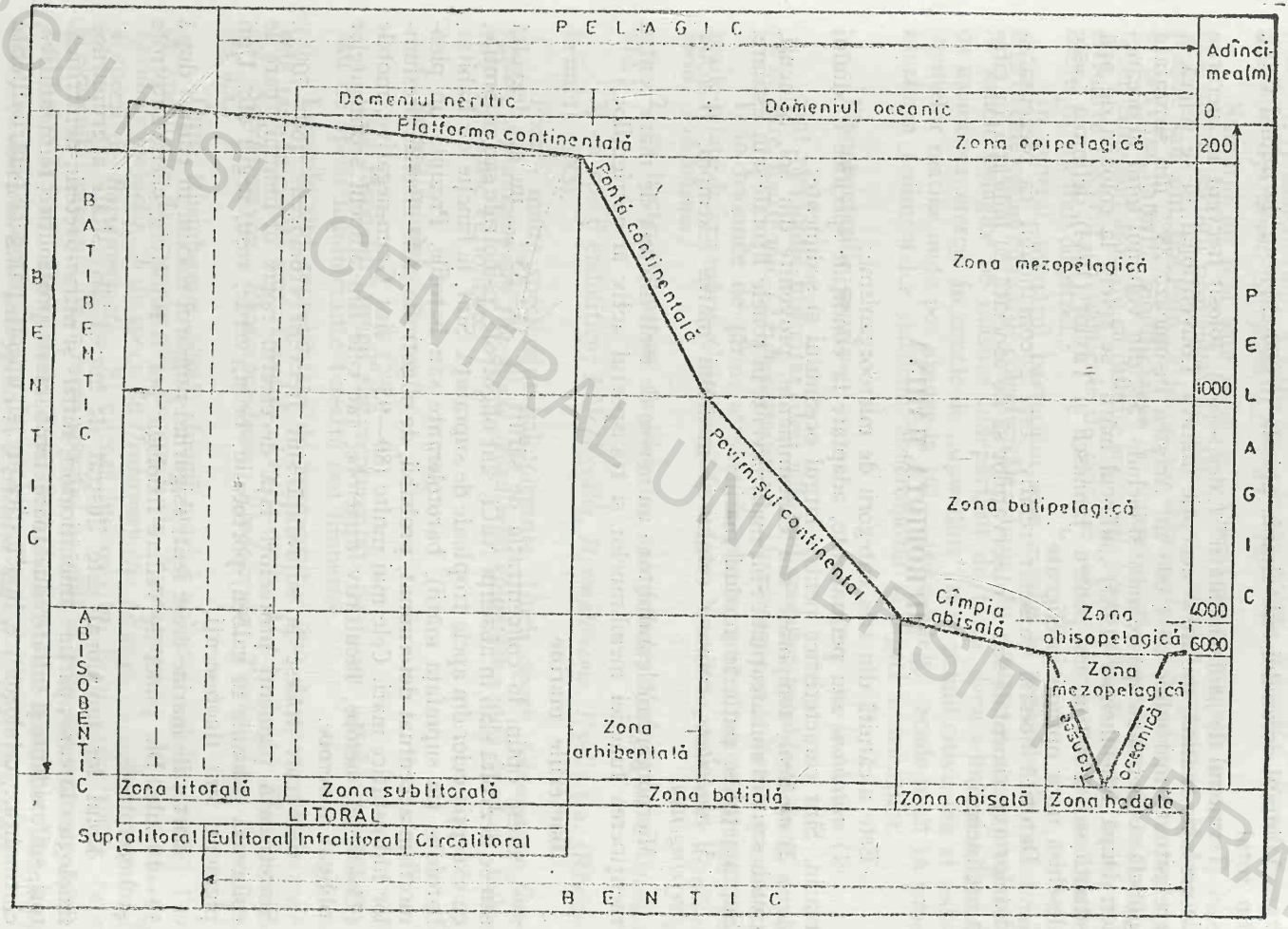



Fig. 269. — Reprezentarea schematică a zonării ecologice a mediului marin (după Lincoln, Boxshall şi Clark, 1982).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Adîncimea maximă investigată este de 11 034 m, în „tranșeea" Marianelor din Oceanul Pacific.

Volumul oceanului sub cîmpia abisală (6 000 m) este de numai 0,1% din total.

Termenul de „adîncul mării" („deep-sea"), folosit frecvent în lucrările de ecologie marină, nu are o accepție unitară. Convențional, el se referă la ape situate mai adînc de 1 000 m. Acestea însumează 88% din suprafața globală acoperită cu apă de mare și include 75% din volumul total al oceanelor. După Rheinheimer (1985) „adîncul mării" se referă la coloana de apă situată sub 2 000 m, iar pentru Jannasch și Taylor (1984), definirea „este deschisă unor opțiuni inteligente".

Datorită acestui caracter relativ, este recomandabil ca prezentarea datelor experimentale sau a observațiilor să fie asociată cu indicația în cifre a adîncimii.

## MICROBIOTA MARINĂ

Este alcătuită din trei categorii de microorganisme:

1) *autohtone* sau permanente, adaptate la condițiile specifice mediului marin. Sînt caracteristice pentru largul oceanului și sedimente;

2) *alohtone*, temporare sau contaminante, provenite din sol, afluenți, canale sau din ambarcațiuni. Sînt mai frecvente în zonele litorale și în estuare. Supraviețuiesc puțin în mediul marin;

3) *ubicvitare*, comune solului și mediului marin (exemplu, *Welchia perfringens*).

Microorganismele autohtone au nevoie de ionii din apa de mare pentru menținerea funcției membranelor și transportul activ al nutrienților.

### Bacteriile marine

Cresc optim la concentrația de săruri de 33—35‰, nu se dezvoltă sau se dezvoltă slab în absența NaCl, sînt oligotrofe, psihotrofe sau psihrofile, cu excepția celor din apele tropicale de suprafață. Sînt, în funcție de habitat, barofobe (la suprafața mării), barotolerante sau barofile. Prezintă un pleomorfism accentuat determinat, probabil, de oligotrofie și de efectele presiunilor hidrostatice mari. Cele mai multe (80—95%) sînt Gram-negative, mobile (75—85%), aerobe, facultativ anaerobe, iar cele din adîncul sedimentelor obligat anaerobe.

Cele care trăiesc la suprafață sînt frecvent cromogene (60—70%). Sintetizează pigmenți protectori față de efectul nociv al luminii, care le colorează coloniile în galben, portocaliu, brun, verde, roșu, negru etc. Unii pigmenți sînt fluorescenți.

Bacteriile marine cresc lent, asigurînd numărul maxim în culturi după 14—18 zile. Din punct de vedere fiziologic pot fi fototrofe, chemoautotrofe și heterotrofe.

Rolul lor funcțional este ilustrat de marea diversitate a grupurilor fiziologice la care aparțin: amonificatori, nitrit- și nitrat-bacterii, denitrificatori, sulfoxidante și sulfat-reducătoare, ferobacterii, proteolitice, fermentative, chitinolitice, celulozolitice, lipoclastice etc. și, uneori, patogene pentru diferite animale marine.

Speciile cel mai frecvent întîlnite aparțin genurilor: *Achromobacter, Alcaligenes, Alteromonas, Bacillus, Corynebacterium, Cytophaga, Flavobacterium, Hyphomicrobium, Micrococcus, Microcyclus, Nocardia, Pseudomonas, Sarcina, Spirillum, Streptomyces, Vibrio* etc.

Numărul lor real este greu de estimat din mai multe cauze: 1) cele mai multe bacterii provenite din adînc și-au pierdut capacitatea de multiplicare sau sînt prezente ca forme de supraviețuire; 2) aduse la suprafață se pot liza datorită modificărilor de temperatură și presiune; 3) bacteriile heterotrofe sînt asociate cu diferite suprafețe (alge, animale, pietre, nisip etc.) și foarte frecvent cu particule de detritus, unde găsesc condiții mai bune decît în mediul oligotrof.

În general, numărul bacteriilor este maxim în regiunile litorale (mai ales în cele vecine cu marile colectivități urbane), în estuare și scade progresiv în zonele pelagice pe măsura îndepărtării de țărm și cu adîncimea. Este, de asemenea, crescut în zonele de „upwelling" și în primii cîțiva cm ai sedimentelor marine unde pot ajunge la $10^7$ — $10^8$ celule/g. Scade mult în profunzimea sedimentelor datorită anaerobiozei și lipsei nutrienților.

### Cianobacteriile marine

Sînt răspîndite ubicvitar, deși numărul speciilor autohtone este, după cît se pare, foarte mic (*Trichodesmium* sp., *Dermiocarpa* sp.). Pot fi prezente:

1) în regiunile de țărm, atașate de plante, pietre, nisip sau mîl, pe rocile udate de apa mării: *Calothrix, Glococapsa, Nodularia, Rivularia, Oscillatoria, Plectonema;*

2) ca bacterioplancton: *Oscillatoria, Pelagothrix, Katagnymena, Nostoc* etc.;

3) ca specii endolitice: *Entophysalis, Hormatonema, Hyella* ș.a. (Rheinheimer, 1985).

Foarte multe specii sînt halotolerante. Unele specii (*Anabaena flos-aquae, Aphanizomenon flos-aquae, Nodularia spumigena* etc.) produc „înfloriri" în zonele eutrofizate.

### Fungii marini

Larg răspîndiți, fungii sînt reprezentați de forme autohtone, halofile sau de specii halotolerante terestre sau limnetice.

Levurile sînt reprezentate de aproximativ 200 de specii dintre care cele mai frecvente sînt: *Candida, Cryptococcus, Metchnikovia, Kluyveromyces, Saccharomyces, Rhodosporidium, Rhodotorula, Trichosporon, Torulopsis* ș.a.

După Rheinheimer (1985), fungii marini obligați, halofili, includ 149 de specii de *Ascomycetes*, 91 de specii de *Pyrenomycetes*, 51 de specii de *Loculoascomycetes*, 56 de specii de *Deuteromycetes (Fungi imperfecti)* și numai 4 specii de *Basidiomycetes*. El citează lucrarea lui Kohlmeyer (1977), care a evidențiat prezența unor fungi specifici barofili la adîncimi cuprinse între 1 615 și 5 315 m: *Bathyascens vermisporus* și *Oceanitis scuticella (Ascomycetes)* și *Allescheriella bathygena* și *Periconia abissa (Fungi imperfecti).*

### Algele marine

Producători primari cu importanță fundamentală pentru existența vieții în mediul marin, algele formează fitoplanctonul prezent în concentrație maximă în stratul superior al zonei eufotice, variind ca densitate în funcție de o serie de factori (în primul rînd de claritatea apei) între 0 și 50 m.

Imensa lor majoritate sînt fotoautotrofe. Unele cresc și heterotrof în întuneric prin asimilarea unor substanțe organice (glucide, acizi organici etc.). Altele nu cresc în întuneric, însă creșterea lor la lumină poate fi accelerată de prezența substanțelor organice (fac fotoasimilare) (Willovghby, 1976).

După Provasoli (1963) și Vishniac (1971), cei mai importanți producători primari sînt:

1) **Chlorophyta:** *Dunaliella euchlora, Chlorella* sp., *Chlamydomonas, Chlorococcus, Pyramimonas inconstans).*

2) **Diatomeae:** *Cyclotella, Melosira* sp., *Nitzschia brevirostris* etc. Ele pot fi grupate, după Atlas și Bartha (1987), în trei categorii:

a) *holoplanctonice* — alge litorale sau pelagice, care trăiesc permanent în mediul acvatic în sensul că nu au nevoie de o perioadă de existență la fundul oceanului pentru completarea ciclului de viață;

b) *libere meroplanctonice* — temporar libere, cu perioade din ciclul de viață la fundul mării;

c) atașate de un substrat majoritatea ciclului de viață *(tichopelagice).* Ajung în apele de suprafață numai dacă se desprind de habitatul lor obișnuit.

3) **Dinoflagellatae:** *Amphidinium carteri, Katodinium, Prorocentrum.*

4) **Chrysomonadaceae** și **Cryptophyceae:** *Isochrisis galbana, Monochrysis lutheri, Prymnesium parvum, Rhodomonas* sp.

Se adaugă numeroase specii de *Rhodophyceae* și *Euglenophyta.*

Algele brune *(Phăcophycophyta),* reprezentînd 1 500 de specii aproape exclusiv marine, se dezvoltă în apele tropicale clare, pînă la adîncimea de 200 m (fig. 270).

### Protozoarele marine

Acestea sînt: flagelate, rizopode și ciliate, componenți ai zooplanctonului.

Cele autohtone prezintă un grad important de halofilie. După Atlas și Bartha (1987), cel mai important constituent al zooplanctonului marin sînt flagelatele *Coccolithophoridae,* la care se adaugă specii de *Acantharia, Tintinnidium* și, în special, *radiolari,* care pot fi găsite și între 350 și 5 000 m.

Particularitatea fundamentală a microorganismelor ce trăiesc în adîncul mărilor și al oceanelor este ritmul lent al activității metabolice. Factorii determinanți majori sînt: 1) disponibilitatea redusă de nutrienți și energie; 2) presiunea hidrostatică mărită corelat cu adîncimea; 3) temperatura scăzută a mediului ambiant.

Pe baza unor experiențe *in situ,* Jannasch și Wirsen (1977) au demonstrat că la adîncimea de 5 300 m, nutrienții sînt degradați cu o viteză de o sută de ori mai mică decît la aceeași temperatură la suprafață. Această particularitate este exteriorizată în ritmul lent al creșterii și multiplicării bacteriilor, care au la 5 500 m un timp de generație de 210 ore. Comporta-

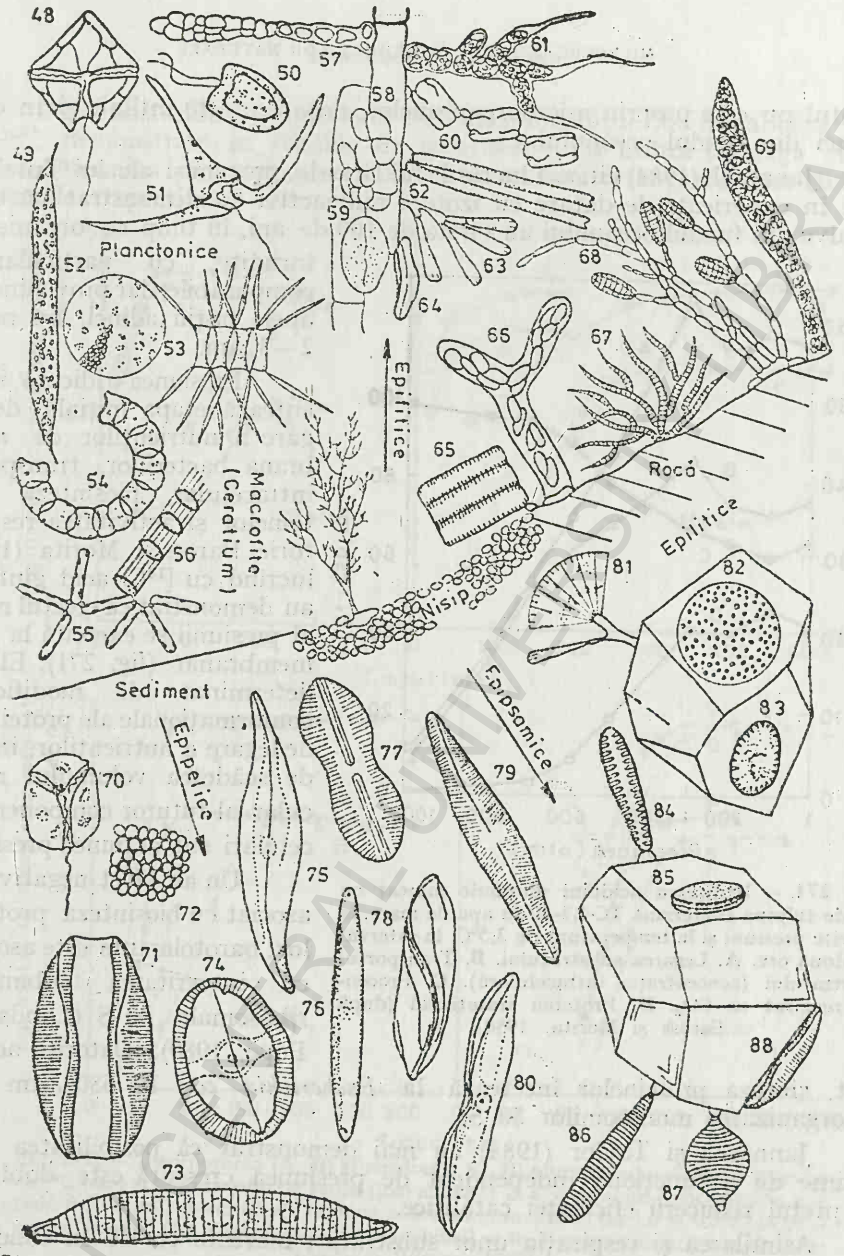



Fig. 270. — Cianobacterii și alge prezente în comunitățile de microorganisme marine (după Round, 1977). **Planctonice: 48.** *Peridinium* (D). **49.** *Rhizosolenia* (B). **50.** *Hymenomonas* (Chry). **51.** *Ceratium* (D). **52.** *Coscinodiscus* (B). **53.** *Chaetoceros* (B). **54.** *Eucampia* (B). **55.** *Thalassionema* (B). **56.** *Scelctonema* ( ). **Epilitice: 57.** *Erythrotrichia* (R). **58.** *Pleurocapsa* (Cy). **59.** *Cocconeis* (B). **60.** *Grammatophora* (B). **61.** *Bulbochacte* (Ch). **62.** *Synedra* (B). **63.** *Licmophora* (B). **64.** *Cymbella* (B). **Epilitice: 65.** *Fragillaria* (B). **66.** *Navicula* (B). **67.** *Rivularia* (Cy). **68.** *Ectocarpus* (P). **69.** *Bangia* (R). **Epipelitice: 70.** *Amphidinium* (D). **71.** *Amphora* (B). **72.** *Holopedia* (Cy). **73.** *Hantzschia* (B). **74.** *Mastogloia* (B). **75.** *Pleurosigma* (B). **76.** *Nitzschia* (B). **77.** *Diploneis* (B). **78.** *Amphiprora* (B). **79.** *Navicula* (B). **80.** *Tropidoneis* (B). **Epipsamice: 81.** *Licmophora* (B). **82.** *Coscinodiscus* (B). **83.** *Cocconeis* (B). **84.** *Opephora* (B). **85.** *Cocconeis* (B). **86.** *Licmophora* (B). **87.** *Raphoneis* (B). **88.** *Amphora* (B).

Cheia abrevierilor: Cy — cianobacterii; B — *Bacillaryophyta*; Ch — *Chlorophyta*; D — *Dynophyta*; Chry — *Chrysophyta*; R — *Rhodophyta*; P — *Phaeophyta*.

BCU CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

mentul nu este propriu microorganismelor, deoarece este întîlnit și în cazul faunei din fundul oceanului.

Jannasch (1984) citează lucrările lui Grassle, precum și ale lui Turekian, care în experiențe de datare cu izotopi radioactivi au demonstrat că unele bivalve din fundul oceanului au vîrsta de 100 de ani, în timp ce organismele înrudite, cu particularități comparabile, dar provenind din apele puțin adînci, au numai 2—3 ani.

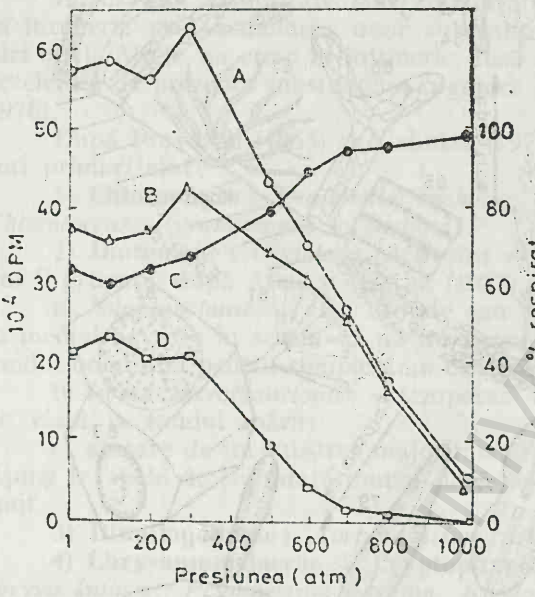



Fig. 271. — Utilizarea acidului glutamic marcat cu $^{14}C$ de tulpina bacteriană TC-L1-10 în apa de mare, la diferite presiuni și la temperatura de 3,5°C, în interval de două ore. **A.** Legarea substratului. **B.** Transportul substratului (concentrația intracelulară). **C.** Procentul respirat ca $CO_2$. **D.** Proteina sintetizată (după Baross și Morita, 1980).

Presiunea ridicată influențează etapa inițială de legare a nutrienților de membrana bacteriilor, transportul intracelular, biosinteza proteinelor și activitatea respiratorie. Baross și Morita (1980), lucrînd cu [$^{14}C$] acid glutamic au demonstrat că efectul major al presiunii se exercită la nivel membranar (fig. 271). El este determinat de modificările conformaționale ale proteinelor de legare a nutrienților, induse de scăderea volumului molecular al tuturor componenților celulari sub acțiunea presiunii.

Un alt efect negativ este asociat cu biosinteza proteinelor: barotoleranța este asociată cu integritatea subunității ribosomale 30 S (Landau și Pope, 1980). Datorită acestui fapt, sinteza proteinelor încetează la *Escherichia coli* la 680 atm prin dezorganizarea monosomilor 30 S.

Jannasch și Taylor (1984) au mai demonstrat că posibilitatea unei enzime de a funcționa independent de presiunea crescută este dobîndită cu prețul reducerii eficienței catalitice.

Asimilarea și respirația unor substraturi marcate cu $^{14}C$ în condițiile unor presiuni crescute variază mult în funcție de natura substratului (fig. 272). Conversia glutamatului este cel mai mult afectată de presiune, în timp ce utilizarea acetatului este între 90 și 100% barotolerată, adică neafectată de presiune. Metabolismul glucozei și al acizilor cazaminici marcați are o comportare intermediară față de efectele presiunii (Jannasch și Wirsen, 1982, 1984). După Morita (1976), ea reprezintă o „binefacere (binecuvîntare) mascată" („A blessing in disguise"), deoarece o viteză metabolică mare ar consuma întreaga materie organică din ecosistem.

Dacă bacteriile ar funcționa cu particularitățile lor metabolice „normale", demonstrate în studiile de laborator *, ar utiliza întreaga energie și ar determina moartea prin înfometare a tuturor organismelor din ecosistemele respective.

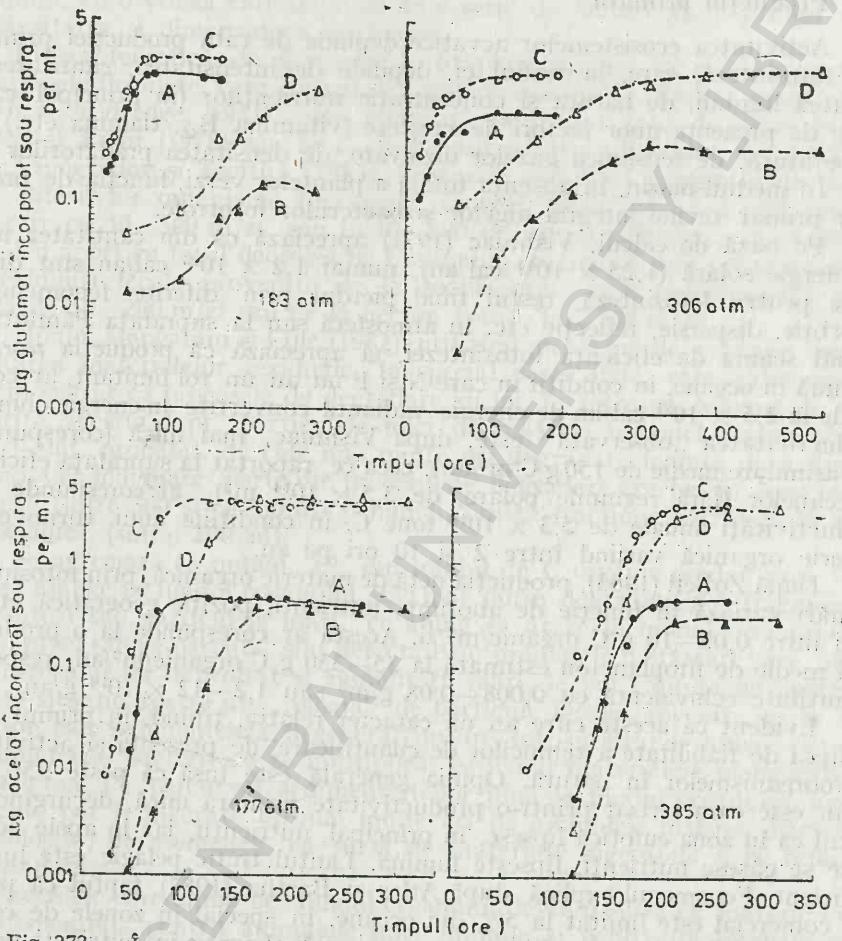



Fig. 272. — Încorporarea (**A**, **B**) și respirația (**C**, **D**) glutamatului de sodiu marcat cu $^{14}C$ (sus) și a acetatului de sodiu (jos) adăugat la apa de mare (concentrația inițială 0,5 mg/ml) colectată de la două adîncimi și incubată (la 3,0 ± 0,5°C) la presiunea *in situ*, fără decompensare (triunghiuri) și la 1 atm (cercuri) (după Jannasch și Wirsen, 1982).

Prezența substanțelor organice „recalcitrante" la suprafața sedimentelor și în apele adînci ale oceanelor este *per se* un alt factor care determină o încetinire a proceselor metabolice.

Ansamblul acestor condiții care nu permit o dezvoltare luxuriantă a microorganismelor fac, totuși, ca, în ultimă instanță, comunitățile de microorganisme să evolueze la o stare în care trăiesc în armonie cu mediul încon-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 17.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

jurător specific. În felul acesta, departe de a fi un inconvenient, viteza metabolică încetinită a bacteriilor din adîncul mărilor și din sedimente are o mare importanță ecologică.

### Producția primară

Activitatea ecosistemelor acvatice depinde de rata producției primare prin fotosinteză, care, la rîndul ei, depinde de intensitatea, cantitatea și calitatea luminii, de natura și concentrația nutrienților (în principal ca N și P), de prezența unor factori de creștere (vitamina $B_{12}$, tiamina etc.), de temperatură, de tensiunea gazelor dizolvate, de densitatea prădătorilor etc.

În mediul marin, în absența totală a plantelor verzi, funcția de producător primar revine integral algelor și bacteriilor fototrofe.

Pe bază de calcul, Vishniac (1971) apreciază că din cantitatea mare de energie solară ($1{,}25 \times 10^{24}$ cal/an), numai $1{,}2 \times 10^{23}$ cal/an sînt disponibile pentru fotosinteză, restul fiind pierdut prin diferite fenomene de absorbție, dispersie, reflecție etc. în atmosferă sau la suprafața Pămîntului. Ținînd seama de eficiența fotosintezei, el apreciază că producția *teoretică* maximă în oceane, în condiții în care N și P nu au un rol limitant, ar corespunde la $2{,}5 \times 10^{21}$ cal/an de energie radiantă convertite în energie chimică. Productivitatea „observată" este, după Vishniac, mai mică (corespunzînd la o asimilare medie de 150 g C/m²/an), ceea ce, raportat la suprafața eficientă a oceanelor (fără regiunile polare, de $3{,}5 \times 10^{14}$ m²), ar corespunde unei productivități anuale de $5{,}3 \times 10^{10}$ tone C, în condițiile unui turnover de materie organică variind între 2 și 10 ori pe an.

După ZoBell (1963), producția netă de materie organică, prin fotosinteză în mări variază în funcție de anotimp, nutrienți, poziție geografică etc. și ar fi între 0,03—10 g C organic/m²/zi. Acesta ar corespunde la o producție netă medie de fitoplancton estimată la 35—350 g C organic/m²/an, respectiv o cantitate echivalentă cu 0,008—0,08 g/m³ sau $1{,}2—12 \times 10^{16}$ g/an.

Evident că aceste cifre au un caracter relativ, ținînd, în primul rînd, de lipsa de fiabilitate a tehnicilor de cuantificare, de prezența și activitatea microorganismelor în natură. Opinia generală este însă că peste 95% din ocean este caracterizat printr-o productivitate primară mică, decurgînd din faptul că în zona eufotică lipsesc, în principal, nutrienții, iar în apele adînci, unde se găsesc nutrienți, lipsește lumina. Lanțul trofic pelagic este lung și ineficient, Fenomenul explică, după Atlas și Bartha (1987), faptul că pescuitul comercial este limitat la 5% din oceane, în special în zonele de coastă și ale curenților de „upwelling", în care apele bogate în nutrienți permit randamente mari. În aceste zone, producătorii primari sînt formele planctonice mai mari, iar lanțurile trofice sînt mult mai scurte și mai eficiente.

După aceiași autori, o altă consecință a producției primare reduse este că animalele marine au de luptat cu o aprovizionare săracă și imprevizibilă în nutrienți. Aceasta ar fi determinat adaptarea lor la prînzuri masive și rare și la o rată metabolică lentă la temperaturi joase și presiuni ridicate.

## DEGRADAREA SUBSTANȚELOR ORGANICE ÎN OCEANE

Jannasch și Taylor (1984) consideră că 90%, iar Brewer și colab. (1980) chiar 95% din totalul substanței organice produsă prin fotosinteză este degradată și reciclată în stratul superior, respectiv în cei 100—300 m

de la suprafața oceanului. Acest proces afectează, practic, totalitatea carbonului organic dizolvat (DOC) și o parte din cel prezent în formă particulată (POC). Restul de 5—10%, reprezentînd, deci, materiale organice prezente în special sub formă de particule, este depus prin sedimentare spre fundul oceanului, cu o viteză care depinde de o serie de factori și, în primul rînd, de densitatea și dimensiunea particulei.

Viteza teoretică de depunere a fitoplanctonului, ca și a agregatelor de particule floculate, care constituie „zăpada marină" („Marine snow" după Silver și Alldredge, 1981), este apreciată la 0,1—1 m/zi de către Silver, Shanks și Trent (1978) sau la 1—50 de ani pentru adîncimea de 5 000 m, după Vinogradov și Tseitlin (1983). Resturile mai mari provenite din cadavrele diferitelor organisme (decapode, creveți, pești etc.) cad mai repede, respectiv cu 50—500 m/zi sau în 10—100 de ore la adîncimea de 5 000 m.

Un aport cu totul deosebit de C organic particulat este cel reprezentat de reziduuri fecale provenite de la zooplancton, care sedimentează cu o viteză de 50—200 m/zi sau de la necton (pînă la 2 700 m/zi).

Honjo, Manganini și Cole (1982), utilizînd un sistem de capcane pentru recoltarea materialelor reziduale, în special particulate, care sedimentează au demonstrat că procesele de degradare au loc în întreaga coloană de apă. Datorită acestui fapt, particulele mici de materie organică sedimentează lent și sînt, probabil, de cele mai multe ori degradate înainte de a ajunge la fund. Cea mai mare parte din procesul de degradare are loc în zona mezopelagică (între 300 și 1 200 m) și numai o mică fracțiune pătrunde în zona batipelagică (sub 1 200 m).

Se apreciază că numai 1% din totalul de C organic produs prin fotosinteză ajunge pe fundul oceanului. Cel mai puțin degradate sînt fragmentele de țesuturi sau particulele mari, ce ajung ca atare la fundul oceanului și, la acel nivel sau pe parcurs, sînt detectate de animalele înotătoare care, datorită mirosului lor dezvoltat și mobilității mari, le pot captura cu ușurință.

O situație aparte are „ploaia" de particule fecale provenite de la zooplancton care sedimentează, în general, învelite într-un strat de mucus populat de numeroase bacterii ce se multiplică, utilizînd materialele nedigerate de zooplancton. Pe parcursul sedimentării lor pînă la fundul oceanului, aceste particule pot fi ingerate de mai multe ori de animalele marine. Bacteriile sînt folosite, de asemenea, ca sursă de materiale digerabile și se refac de fiecare dată.

Fecalele care ajung pe fundul oceanului devin o sursă de materie organică disponibilă pentru animalele mici imobile și pentru microorganismele din sedimente. După Menzies, George și Rowe (1973), celulele microorganismelor sînt depuse la fundul mărilor sub formă de celule moarte nelizate (datorită inactivării enzimelor sub influența temperaturii mici și a presiunii ridicate în stare de latență („înghețate metabolic") sau de celule „înfometate", cu metabolism extrem de atenuat.

Nutrienții acumulați la fundul mării pot fi readuși la suprafață de curenții de „upwelling". Se apreciază că trebuie să treacă mai multe mii de ani pînă cînd o moleculă de nutrienți minerali din fundul oceanului este readusă în zona eufotică a acestuia.

Substanțele „recalcitrante" (rezistente la degradare), ca lignina, resturile celulozice, lipidele, sînt depuse și se acumulează pe fundul oceanului, unde, împreună cu o serie de compuși rezultați din degradare sau din bioconversie, formează *humusul marin*.

În concluzie, datorită acestor procese, caracteristica fundamentală a apelor adînci și a sedimentelor organice, ca habitat pentru organisme, este oligotrofia. Ea este consecința aportului relativ scăzut de C organic din stratul productiv, determinat de consumul acestuia în cursul transportului vertical, îndelungat în timp și spațiu.

Procesul de degradare a materiei organice asigură regenerarea și refacerea rezervelor de nutrienți prin recircularea materiei în mediul acvatic. Rittenberg (1963) a atribuit bacteriilor rolul major în desfășurarea acestui proces în ocean și numeroși alți autori au extins acest rol la alte categorii de ape naturale (lacuri, bălți etc.).

În prezent, majoritatea specialiștilor recunosc rolul esențial al bacteriilor și al microfungilor în mineralizarea substanțelor organice, asigurînd, prin aceasta, refacerea nutrienților necesari pentru creșterea plantelor. Mineralizarea completă este atinsă numai în prezența oxigenului. În anaerobioză, ca și în alte situații, degradarea este numai incompletă.

O funcție deosebit de importantă a bacteriilor este aceea de conversie a materiei organice dizolvate în celulele bacteriene și reintroducerea acesteia în lanțul trofic sub o formă particulată (biomasă nutritivă), accesibilă animalelor care se hrănesc prin filtrare.

Wright și Hobbie (1965) au demonstrat experimental capacitatea bacteriilor de a îngloba și asimila compușii organici dizolvați în concentrații extrem de mici cu o foarte mare eficiență. Această proprietate le conferă un avantaj selectiv față de microalgele heterotrofe în mediile acvatice oligotrofe.

Fără a nega rolul esențial al bacteriilor în procesele de mineralizare în mediile acvatice, Johannes (1968) consideră că acest rol este exagerat de unii cercetători, care pornesc de la premisa că în ape funcționează aceleași cicluri standard ale nutrienților descrise ca tipice în sol, fără a ține seama de evoluția altor mecanisme asociate.

Urmărind în mod particular căile de transfer și de regenerare ale compușilor azotului și ai fosforului, Johannes consideră că N și P încorporate în plante și animale este, de regulă, în mare parte, regenerat prin procese diferite de cele microbiene.

Pe baza unor date din literatură, el afirmă că zooplanctonul este, probabil, chiar cel mai important regenerator de nutrienți pentru plante, deoarece furnizează o fracțiune majoră din nutrienții necesari fitoplanctonului în lacuri, estuare și oceane.

Afirmația se bazează pe următoarele fapte de observație:

1) Datorită consumului rapid al hranei și vitezei mari de metabolism, zooplanctonul eliberează în 20—200 de ore cantități de P și N dizolvat, egale cu conținutul total al organismului lor. Datorită acestui fapt, în cursul vieții, zooplanctonul eliberează în mediul ambiant de mai multe ori cantitatea de P și N disponibilă pentru regenerare după moartea sa.

2) Microzooplanctonul eliberează în apă compuși ai P cu viteză mult mai mare decît animalele mari (fig. 273). Determinările efectuate pe patru specii de ciliate marine au demonstrat că acestea elimină în 0,2—3,4 ore o cantitate de P dizolvat egală cu cantitatea de P total celular.

3) Aceste observații explică de ce între viteza de regenerare a nutrienților și numărul bacteriilor nu există o corelație, după cum s-a crezut inițial. După Johannes (1968), prezența unui număr mare de bacterii nu consti-

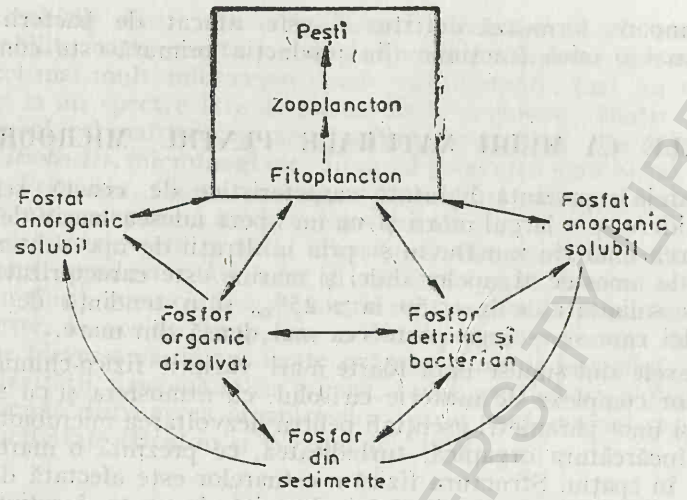



Fig. 273. — Căile principale de recirculare a fosforului în mediul marin (după Parsons, Takahashi și Hargrave, 1977).

tuie o probă de regenerare rapidă, ci, din contră, în anumite situații poate evidenția chiar un fenomen invers, de asimilare rapidă a nutrienților dizolvați. De aceea, în acest ciclu (fig. 274), bacteriile ar furniza numai o fracțiune relativ mică din nutrienții regenerați, iar uneori chiar ar competiționa cu plantele pentru utilizarea acestora. Această situație radical deosebită de sol s-ar explica, cel puțin în cazul elementelor citate (N și P) prin faptul că în ecosistemele acvatice o mare parte din producția primară este consumată și metabolizată de zooplanctonul fitofag, în timp ce în ecosistemele terestre predomină adesea lanțul trofic detritic: cea mai mare parte din materialul vegetativ ne-

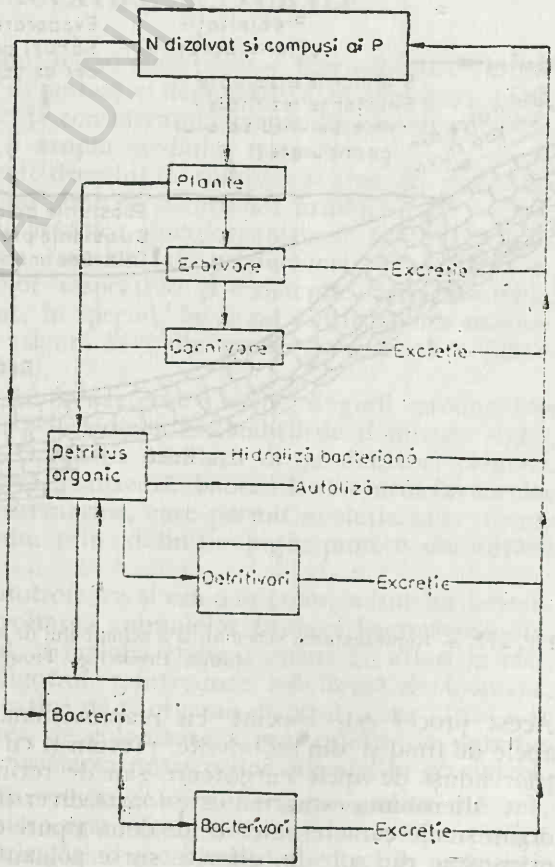



Fig. 274. — Căile de transfer și de regenerare ale fosforului și azotului în ecosistemele acvatice (după Johannes, 1968).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

consumat moare, formează detritus și este atacat de bacterii și micro-fungi. Numai o mică fracțiune din producția primară este consumată de fitofage.

## ESTUARELE CA MEDII NATURALE PENTRU MICROORGANISME

Estuarele reprezintă habitate caracteristice de coastă semi-închise, cu o deschidere spre largul mării și cu un aport adesea masiv de apă dulce prin vărsarea unui rîu sau fluviu și prin infiltrații de ape subterane. Fiind o regiune de amestec al apelor dulci și marine este caracterizată printr-un gradient de salinitate de la $< 50$ la $> 25‰$ și o tendință de stratificare a apei dulci care se scurge peste cea mai densă din mare.

Estuarele sînt supuse unor foarte mari variații fizico-chimice datorită schimburilor complexe de materie cu solul, cu atmosfera și cu sedimentele (fig. 275) și unor parametri esențiali pentru dezvoltarea microbiotei ca temperatura, încărcătura organică, turbiditatea, ce prezintă o mare fluctuație în timp și în spațiu. Structura fizică a estuarelor este afectată de procesele de sedimentare ale încărcăturii rîului, datorită, în parte, încetinirii curgerii și, în parte, precipitării particulelor în contact cu ionii din apa de mare.

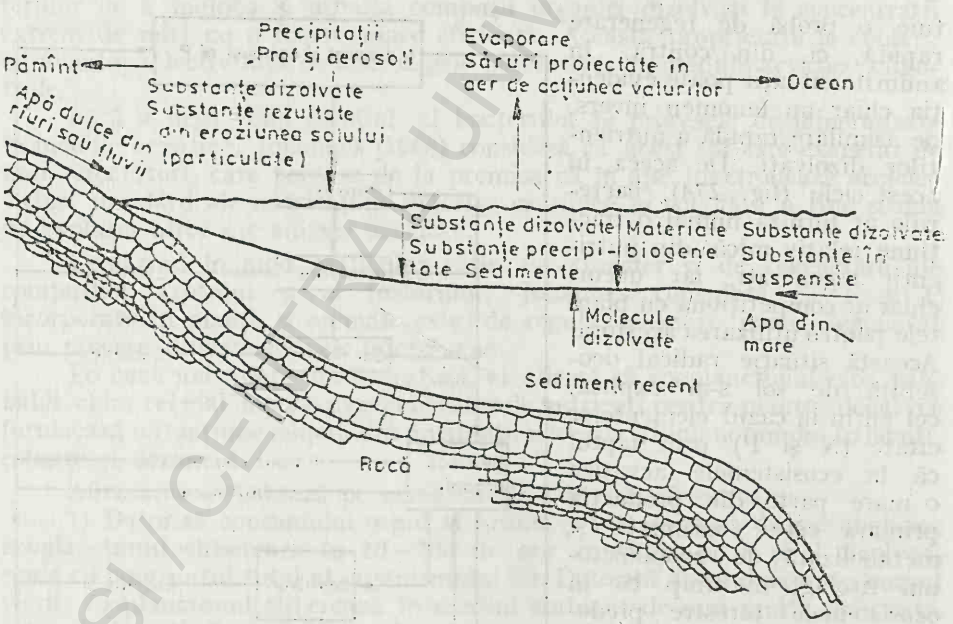



Fig. 275. — Reprezentarea schematică a schimbului de materie într-un sistem estuarin idealizat (după Bricker și Troup, 1975).

Acest proces este asociat cu reaprovizionarea constantă cu nutrienți din apele de fund și din sedimente, precum și cu tendința de captare a nutrienților aduși de apele curgătoare sau de reținere a celor produși local.

Microbiota estuarină este foarte diversificată și include, pe lîngă micro-organismele caracteristice celor două tipuri de ape (dulci și marine), micro-organisme din sol, din diferite surse poluante (ape uzate, agricole și indus-

triale). Deosebirile dintre microorganismele autohtone și cele alohtone sînt greu de stabilit, foarte multe specii fiind numai temporar prezente. Supraviețuiesc cel mai mult microorganismele euritolerante, care au capacitatea de a rezista la un spectru larg de factori fizici și chimici. Dintre microorganismele din sol, cel mai frecvent sînt întîlnite bacterii ca: *Azotobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, microfungi etc. În cazul prezenței unor surse de poluare se adaugă: *Beggiatoa*, *Clostridium* sp., *Sphaerotilus natans*, *Thiobacillus* sp., *Bacillus* sp. etc., precum și unele enterovirusuri.

Mediul estuarin este o zonă importantă din punct de vedere biologic datorită marii productivități care îl caracterizează (superioară celei din ocean și din rîuri), consecință a depunerii nutrienților la gura rîurilor sau în delte. El este, în același timp, un mediu frecvent perturbat de activități antropogene (deversarea de ape uzate orășenești sau industriale), care, adăugate complexității fizico-chimice proprii, induc perturbări biologice, avînd drept consecință distrugerea organismelor într-o zonă normal capabilă de o mare productivitate (Benton și Werner Jr., 1974).

## ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN BAZINELE ACVATICE NATURALE

Mediile acvatice naturale sînt sediul unor procese fizico-chimice variate, care influențează metabolismul de sinteză și degradativ al microorganismelor. La rîndul lor, acestea au o influență considerabilă asupra populațiilor de organisme vegetale și animale, ca și asupra mediului respectiv.

Rolul microorganismelor este deosebit de complex și greu de sintetizat. Între cele mai importante acțiuni sînt de menționat următoarele:

— În cele mai multe medii acvatice, microorganismele fotosintetizante (alge și cianobacterii) au funcția esențială de producători primari majori, care asigură „fertilitatea" apelor respective și existența vieții la nivelul acestora. Acest fapt este evident, în special, în cazul ecosistemelor marine, în care algele și cianobacteriile asigură 35% din producția primară a planetei (Round, 1981; Stewart, 1983).

— Bacteriile fototrofe („Anoxybacteria") sînt singurii producători primari în regiunile disfotice ale apelor adînci, în condiții de iluminare slabă, în absența $O_2$ și prezența $H_2S$. O funcție similară de producători primari, determinată însă prin chemosinteză, realizează bacteriile din jurul izvoarelor termale din regiunile vulcanice submarine, care permit evoluția unor forme de viață luxuriante într-un mediu prin definiție puțin propice dezvoltării masive a organismelor vii.

— Biomasa organismelor fototrofe, ca și cea a microorganismelor heterotrofe are un rol esențial în dezvoltarea animalelor fitofage bacterivore etc.

— Capacitatea bacteriilor de a îngloba eficient nutrienții aflați în concentrații foarte mici în mediile oligotrofe reintroduce, sub formă de biomasă, în lanțul trofic cantități semnificative de C organic dizolvat, care altfel s-ar pierde. De asemenea, capacitatea de colonizare a particulelor de detritus inițiază un lanț trofic cu rol în reciclarea nutrienților organici în ecosistem.

— Utilizînd o gamă largă de substanțe organice și anorganice din sol, resturi vegetale sau animale, microorganismele introduc în rețeaua trofică autohtonă substanțe alohtone, îmbogățind ecosistemul oligotrof în nutrienți.

— Microorganismele acvatice au un rol esențial în conversia substanțelor vegetale și animale în materie anorganică, prin procesele de mineralizare, care restituie organismelor fotosintetizante nutrienții esențiali pentru continuarea activității lor. Pe scară globală, aceste procese fac parte din ciclurile biogeochimice, care asigură transformările și recircularea elementelor biogene (C, N, S, P, Mn, Fe etc.) în natură (fig. 276).

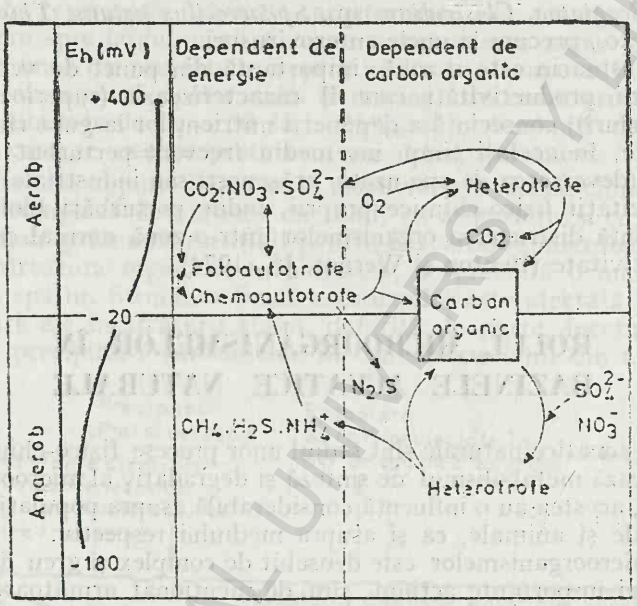



Fig. 276. — Ciclurile dependente de energie și de carbonul organic în mediile marine aerobe și anaerobe (după Parsons, Takahashi și Hargrave, 1977).

— Microorganismele efectuează o serie de reacții care modifică valorile de pH, $E_h$ și alte condiții esențiale pentru existența vieții în diferite zone ecologice ale mediilor acvatice.

— Ele degradează substanțele „recalcitrante", asimilează o gamă largă de produși rezultați și reintroduc în rețeaua trofică substanțe inaccesibile altor categorii de organisme.

— Reprezintă o sursă de vitamine, factori de creștere, substanțe stimulatoare sau inhibitoare (al căror rol în natură este greu de estimat din cauza diluției), dar și o sursă de exploatare *in vitro*, în special, pentru producerea de antibiotice, enzime, citostatice etc.

— Acționează foarte eficient ca agenți geochimici cu rol complex: a) în geneza zăcămintelor de petrol; b) în diageneza rocilor (proces fizico-chimic complex în particular de compactare a particulelor depuse sub formă de sedimente cu transformarea lor în roci sedimentare; c) în depuneri de compuși ai Fe, Mn, S etc.

— Microorganismele acvatice pot avea și o serie de activități negative ca, de exemplu, cele legate de procesele de biodeteriorare și coroziune, care afectează navele, instalațiile portuare, structurile submerse, echipamentul de pescuit etc.

De asemenea, pot determina pagube economice importante datorită fenomenului de fuling, contaminării și infectării unor bunuri cu importanță economică, bolilor produse la plante și animale, alterarea apei prin consumul de $O_2$, producerea de $H_2S$ etc.

## Microorganismele ca sursă de hrană în ecosistemele acvatice

Producătorii primari, respectiv algele, reprezintă sursa majoră de hrană pentru nevertebratele mici ale zooplanctonului fitofag (consumatorii primari). La rîndul lor, aceștia sînt consumați de nevertebrate mai mari (consumatorii secundari), care sînt preluați de pești. La fiecare etapă se adaugă un supliment de nutrienți, sub formă de bacterii și fungi, datorită caracterului ubicvitar al acestora. Cu cît animalele cresc ca mărime, importanța bacteriilor și a fungilor în alimentația lor scade, în așa fel încît pentru consumatorii finali aceasta este nulă.

Semnificația exactă a diferitelor microorganisme ca sursă de hrană este greu de apreciat. Porter (1973) a urmărit experimental digestibilitatea fitoplanctonului și a cianobacteriilor într-un lac mezotrof, corelat cu evoluția unei populații de zooplancton, și a demonstrat existența unei selectivități cu importanță ecologică deosebită.

Astfel, diatomeele mari și criptomonadele sînt folosite ca hrană și digerate pînă la dispariție.

Cianobacteriile (*Anabaena* sp.) sînt necomestibile, după el, din cauza formei, a tecii gelatinoase și a unor proprietăți chimice. La fel se comportă dinoflagelatele și desmidialele.

Algele verzi mari, gelatinoase (*Elaktothrix*), sînt ingerate, dar trec nevătămate prin intestinul animalelor, fiind eliminate în număr crescut în apă.

În plus, dificultățile tehnice și lipsa de fiabilitate a unor factori de conversie complică încercările de cuantificare a rolului diferitelor microorganisme ca nutrienți pentru alte forme de viață acvatice. Astfel, determinările numerice ale bacteriilor subestimează situația reală de 10—100 ori. Valoarea biomasei lor este greu de estimat, deoarece volumul celulelor acvatice individuale variază între $< 0{,}005\ \mu m^3$ și $> 5{,}0\ \mu m^3$, deci între 1 și 1 000 (Strickland, 1971). În aprecierea biomasei din zona eufotică, prin dozarea clorofilei *a*, raportul C vegetal/clorofilă variază între 30, în cazul fitoplanctonului „bine hrănit" din regiunea de coastă, și 90 pentru cel din oceanul oligotrof (Strickland, 1971).

După Rheinheimer (1985), este probabil că în unele medii acvatice bogate în microorganisme (lacuri eutrofizate, rîuri poluate, sedimente etc.), bacteriile și fungii ar putea reprezenta o parte importantă din hrana meiofaunei bacterivore. Afirmația se bazează pe existența unei corelații observată în lacurile eutrofizate între numărul bacteriilor și numărul și biomasa protozoarelor. Ca și în studiile *in vitro* privind interacțiunile din culturile mixte de protozoare și bacterii, scăderea numărului bacteriilor determină scăderea bacterivorelor lipsite de hrană. Refacerea populațiilor bacteriene prin multiplicare în condițiile diminuării numărului prădătorilor este urmată de reluarea multiplicării acestora.

După Morita (1979, 1980), numărul relativ redus al bacteriilor în mări s-ar datora și consumului lor de către organismele bacterivore. Ele ar reprezenta principala sursă de nutrienți pentru organismele din bentos. Importanța bacteriilor în nutriția unor nevertebrate a fost demonstrată și experimental. Astfel, bacteriile furnizează aproximativ 50% din nutrienții larvelor de *Simulium* și *Chironomus*. *Simulium* consumă zilnic 11—28 milioane bacterii (2,2—5,6 μg greutate uscată) (Baker și Bradham, 1976, citați de Rheinheimer, 1985). Copepodele marine își înzecesc numărul în 35 de zile în prezența unei hrane reprezentate exclusiv de bacterii.

Importanța bacteriilor în lanțul trofic din mediile acvatice este asociată cu alte activități, ca, de exemplu:

1) Capacitatea lor de a coloniza detritusurile are o semnificație ecologică deosebită, deoarece acestea nu satisfac exigențele nutritive ale detritivorelor (Seki și colab., 1968). Bacteriile transformă un produs cu valoare nutritivă mică $\left(\text{raportul } \frac{C}{N} = \frac{50}{1} \text{ în cazul detritusurilor vegetale}\right)$ într-o biomasă bogată în N, aminoacizi esențiali, acizi nucleici (sursă de N și P) etc. În plus, cînd detritusul este ingerat, populația de microorganisme de pe suprafața lui este detașată în intestinul consumatorului și folosită de acesta ca hrană, în timp ce particula de detritus nedigerată este eliminată ca atare, pentru a relua ciclul, după ce este recolonizată de bacterii (Darnell, 1976).

2) Bacteriile și fungii au în toate apele o funcție importantă de conversie în biomasă microbiană particulată atît a substanțelor organice dizolvate, provenite de la producătorii primari (prin exsudare sau după liza acestora), cît și a celor provenite de la animale sau din surse alohtone, pe care le reintroduc în lanțul trofic.

### Microorganismele ca sursă de hrană în maricultură

Dezvoltarea tehnologiilor de maricultură au determinat utilizarea complexă a microorganismelor ca sursă directă sau indirectă de hrană, în special pentru larvele moluștelor bivalve, ale creveților și peștilor din crescătorii, în sistemele de filtrare biologică, pentru îndepărtarea reziduurilor azotate în sistemele de acvacultură în sistem închis etc.

Cele mai des utilizate sînt algele unicelulare aparținînd unor specii riguros selecționate pentru valoarea lor nutritivă, digestibilitate (evitarea celor cu perete celular gros, teacă mucoasă etc.) și absența toxinelor.

Dintre speciile testate și utilizate pe scară industrială sînt considerate drept cele mai adecvate: *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Cyclotella nana (Thalassiosira pseudonana)*, *Dunaliella euchlora*, *Isochrysis galbana*, *Nitzschia closterium* forma *minutissima*, *Platymonas* sp., *Prorocentrum triangulatum* etc. (Ryther și Goldman, 1975).

Microorganismele sînt implicate în tehnologiile de maricultură și prin efectele lor negative. Ele reprezintă o sursă de fuling și de consum masiv de oxigen în bazinele de creștere intensivă, pe baza acumulării de hrană neconsumată și de reziduuri. De asemenea, ca agenți patogeni pot declanșa epizootii extinse, greu de combătut, așa cum se întîmplă în toate sistemele de creștere intensivă a animalelor.

# ECOLOGIA SURSELOR HIDROTERMALE SUBMARINE

**„Ideea că microorganismele chemosintetizante ar putea înlocui fotosinteza, pentru a asigura existența unui ecosistem prosper, este încă tulburător de neașteptată atît pentru oamenii de știință, cît și pentru profani".**

H. W. JANNASCH

Explorarea geologică a fundului oceanului în zone în care încă au loc procese de așezare a plăcilor de lavă (la o adîncime de 2 000—2 500 m) a dus la descoperirea neașteptată a unor adevărate oaze, populate de comunități complexe, bine dezvoltate, de nevertebrate mari și neobișnuite, asociate cu fenomenele hidrotermale rezultate din circulația apei în rețeaua de fisuri și crevase. Cercetările au fost extinse în diferite regiuni ale oceanului (Coasta de est a Oceanului Pacific, Galapagos Rift*, Gorda Ridge**, bazinul Guaymas etc.) și realizate cu ajutorul submarinelor de cercetare Alvin (Institutul Oceanografic Scripps), Galathea (Danemarca) și Cyana (Franța). Explorările efectuate pînă la adîncimea de 10 000 m au demonstrat că factorul care limitează existența organismelor vii nu este nici temperatura, nici întunericul și nici presiunea ridicată (1 000 atm), ci lipsa de hrană. Ele au confirmat faptul că dezvoltarea, uneori luxuriantă, a comunităților animale este asociată cu prezența unor surse (izbucuri) hidrotermale („Hydrothermal vents").

## Geneză și particularitățile habitatului

În zonele în care, conform teoriei tectonicii plăcilor, fundul oceanului nu este perfect consolidat, mari cantități de căldură pătrund în ocean, odată cu apa supraîncălzită din izbucurile subterane. În geneza lor, un rol important revine regiunilor în care plăcile tectonice se deplasează unele în raport cu altele, celor cu lavă recent extrudată, incomplet consolidată („Pillow lava") sau în care apar fisuri datorită contracției determinate de răcire. În aceste zone, permeabilitatea pentru apa de mare crește, permițînd percolarea ei în subteran prin scoarța terestră, uneori pe adîncimi de cîțiva km. Datorită reacției ei cu roca bazaltică, din care solubilizează diferite substanțe, rezultă o apă de mare foarte mult modificată, un lichid hidrotermal supraîncălzit, acid și puternic reducător, îmbogățit în metale, $H_2$ și $H_2S$, care este proiectat în sus spre fundul oceanului (1—8,5 mmol/kg$^{-1}$, în funcție de gradul de diluție) (fig. 277). Energia geotermală este convertită în energie chimică sub formă de compuși anorganici reduși (Jannasch și Motte, 1985; Laubier, 1989).

---

* *Rift* = fisură în scoarța terestră sau în roci.

** *Ridge* = linia de joncțiune a două suprafețe care se deplasează în sus, una față de alta.

Au fost descrise trei tipuri de izbucuri hidrotermale („Hydrothermal vents"), după forma, temperatura apei și celelalte particularități asociate:

1) **Izbucurile fierbinți** („Hot vents"), cunoscute mai ales sub denumirea de „fumegătorii negri" („Black smokers"), au forma unor hornuri înalte pînă la 15 m, care proiectează cu putere (viteza de 2 $m/s^{-1}$) prin crater apă supraîncălzită, sterilă și anoxică, cu t° de 350 ± 2°C. Jetul are aspectul unor nori negri datorită precipitării sulfurilor polimetalice aflate în apele fierbinți în stare saturată, în urma contactului cu mediul rece înconjurător (2°C).

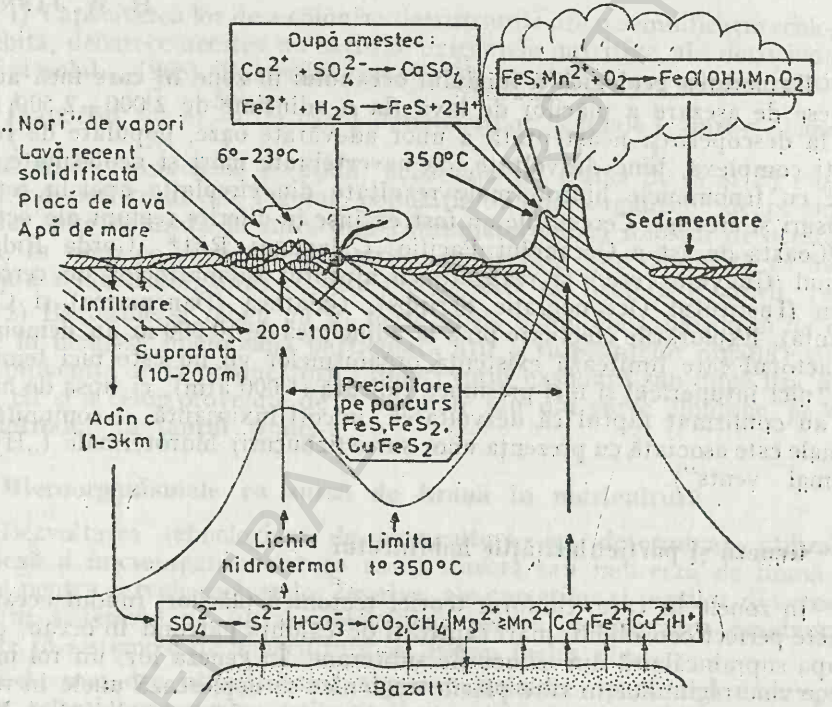



Fig. 277. — Reprezentarea diagramatică a proceselor chimice anorganice ce au loc la nivelul izbucurilor de apă caldă și fierbinte. Apa de mare din adînc este încălzită la 350—400°C și reacționează cu roca bazaltică, eliberînd în soluție diferite tipuri de substanțe. Apa caldă care se ridică pentru a ajunge la fundul oceanului se amestecă cu apa rece. În cursul acestui proces precipită diferite sulfuri minerale de fier, cupru și zinc, ca și anhidrită (după Jannasch și Motte, 1985).

Datorită bogăției în Ca, după amestecul cu apa de mare are loc precipitarea imediată a anhidritei și a sulfurilor minerale de Fe, Cu, Zn etc. și formarea de cratere în jurul deschiderii izbucului fierbinte. Apa eliminată conține mari cantități de $H_2S$ eliberat din rocile bazaltice sau produse prin reducerea $SO_4^{2-}$ din apa de mare, cuplată cu oxidarea $Fe^{2+}$ din bazalt la $Fe^{3+}$.

2) **Izbucurile calde** („Warm hydrothermal vents") elimină o apă lactescentă bogată în $H_2S$ (de aici, denumirea de „fumegătorii albi", „White

smokers"), iridescentă, albăstruie cu o temperatură de 150—270°C, care, uneori, poate să conțină $O_2$.

Craterul lor este înconjurat de colonii cu forma unor globuri albicioase ale viermelui *Alvinella pompejana*.

3) **Emisiunile de apă caldă** elimină apa răcită la 15—40°C datorită amestecului cu apa de mare rece, care s-a infiltrat în stratul poros situat sub suprafața lavei recent solidificate. Apa, avînd un aspect moarat, datorită indicelui de refracție diferit de cel al apei de mare, este emisă cu viteză mică (1—2 $cm/s^{-1}$). Mediul marin înconjurător este rece, cu temperaturi compatibile cu apa de mare la adîncimea respectivă. El conține, pe lîngă $H_2S$, un larg spectru de compuși chimici (metan, $NH_3$, hidrocarburi ușoare etc.).

### Fauna oazelor hidrotermale

În timp ce fundul oceanelor este caracterizat printr-o faună săracă, reprezentată de viermi și crustacee mici și de absența macrofaunei (Enright și colab., 1981), comunitățile de nevertebrate formează colonii bogate, pe o suprafață de cîteva sute de $m^2$ în jurul surselor hidrotermale. Ele cuprind peste 160 de specii, cele mai multe noi pentru știință (Laubier, 1989), identificate, după cum urmează: *Mollusca* cu 41 de specii *(Bivalvia* și *Gastropoda)*, *Annelida* cu 41 de specii *(Polichaeta* și *Hirudina)*, *Arthropoda* cu 44 de specii *(Crustacea, Copepoda, Cirripedia, Amphipoda, Isopoda, Decapoda)*. Au fost evidențiate și două tipuri de pești *(Zoarcide)*, identificați ca *Pachycara* și *Thermarces*.

Relațiile cu microorganismele sînt cel mai bine cunoscute la cîteva specii care au atras atenția prin unele particularități structurale, de creștere etc. și anume:

1) *Riftia pachyptila*, vierme din ord. *Vestimentifera (Pogonophora)*, lung de 2,0—2,5 m, care formează adevărate „tufișuri" în care se găsesc numeroase moluște, polichete, amfipode, decapode etc.

2) *Bivalvele gigante: Calyptogena magnifica* (> 25 cm) și *Bathymodulius thermophilus*.

3) *Alvinella pompejana* („viermele de Pompei") numit astfel de geologi datorită faptului că suportă în permanență o „ploaie" de particule metalice. Este nevertebratul marin cel mai termofil (20—40°C).

Diferite specii de animale sînt dispuse în zone concentrice sau „centuri" în jurul sursei hidrotermale, în funcție de toleranța lor termică și de compoziția chimică a mediului. În sprijinul acestei afirmații pledează și faptul că în zonele în care apa fierbinte a izbucului este diluată cu apă rece din mare se pot observa doi „poli biologici": la polul „apă caldă" se găsesc mari cantități de *A. pompejana*, *A. caudata* și consumatorul lor, crabul carnivor *Cyanagraca praedator*, în timp ce la polul „apă rece" se găsesc viermii vestimentiferi și bivalvele mari.

În mod normal, fauna bentică se hrănește cu materia organică — derivat ultim al fotosintezei — care este depusă la fund ca rezultat al procesului de sedimentare. Ea este insuficientă pentru a explica dezvoltarea unei faune luxuriante, cum este cea din jurul izbucurilor hidrotermale.

Lonsdale (1977) a formulat două ipoteze privind originea nutrienților:

1) Materia organică provenită din straturile superioare ar fi concentrată în jurul surselor termale, prin acțiunea curenților orizontali, rezultați

din convecția provocată de descărcarea lichidelor calde și fierbinți în mediul rece înconjurător. Deși nu poate fi complet înlăturat, acest mecanism nu poate asigura energia necesară dezvoltării atît de masive a faunei oazelor hidrotermale.

2) Intervenția unor microorganisme chimiosintetice, demonstrată ulterior ca esențială.

## MICROBIOTA ECOSISTEMELOR HIDROTERMALE

Microorganismele din jurul izbucurilor termale sînt prezente sub trei forme diferite:

1) suspensii de bacterii libere sau ca grămezi detașate de pe suprafața rocilor;

2) în straturi, uneori groase, de microorganisme depuse pe diferite suprafețe acoperite de apele izbucului;

3) în asociație simbiotică cu nevertebratele.

Din cauza dificultăților tehnice, ele sînt relativ puțin cunoscute. Ținînd seama de natura surselor din mediu, care pot acționa ca donatori sau acceptori de electroni, Jannasch și Mottl (1985) consideră că, teoretic, bacteriile din aceste medii pot aparține următoarelor grupuri fiziologice: 1) sulfoxidante; 2) S- și sulfat-reducătoare; 3) hidrogenoxidante; 4) nitrificatoare; 5) denitrificatoare; 6) metanogene și acetogene; 7) Fe- și Mn-oxidante; 8) metilotrofe și monooxid de C oxidante.

Cîteva din bacteriile prezente au fost identificate, însă cele mai multe sînt descrise pe baza asemănării lor cu forme identificate în medii cu compoziție chimică asemănătoare. Cel mai frecvent întîlnită este *Thiomicrospira pelophila* (asemănătoare cu *Hyphomicrobium*), urmată de bacterii asemănătoare cu *Beggiatoa*, *Thiobacillus*, *Thiothrix* și *Leucothrix*, trichoame asemănătoare cianobacteriilor (de nedeosebit de *Calothrix*). A fost descrisă, de asemenea, o specie nouă de *Methanococcus*, care are temperatura optimă de dezvoltare de 86°C (durata unei generații 26 min).

Pe grupe fiziologice, predomină bacteriile sulfoxidante chemoautotrofe, acidofile obligate, chemoautotrofe facultative (cele mai numeroase) și mixotrofe (capabile să desfășoare simultan metabolism heterotrof și autotrof, fiind stimulate de prezența tiosulfatului). Au fost evidențiate, de asemenea, bacterii care oxidează $H_2$, Fe, Mn, $CH_4$ și CO.

**Abundența** lor este variabilă în funcție de localizare, dar frecvent ating densități care sugerează că ar putea fi sursă de hrană pentru nevertebratele filtratoare. În parte, aceste densități celulare sînt răspunzătoare de aspectul lactescent al unor emisiuni de apă caldă. Densitățile cele mai mari sînt realizate în țesuturile nevertebratelor și pe suprafața rocilor.

În riftul Galapagos, în imediata apropiere a apelor tulburi emise de izvoarele calde, pot atinge densitatea de $10^8 - 10^9/ml^{-1}$, care corespunde unei densități dificil de realizat în condiții uzuale de laborator ($10^9$ bacterii reprezintă o biomasă de $\sim 1$ g/l). La distanță de 1 m de sursă, densitatea este mai mică ($5 \times 10^5 - 10^6$/ml), deci comparabilă cu cea din mediul litoral (Larbaud și Desbruyeres, 1984). În sfîrșit, în jurul izvoarelor fierbinți numărul este și mai redus ($4{,}7 \times 10^5$/ml).

**Activitatea metabolică** *in situ*, studiată cu dispozitive speciale, manipulate din submarinele de explorare, este neașteptat de intensă.

1) Viteza chemosintezei măsurată cu $^{14}CO_2$ la baza unui „fumegător negru" a fost de $10^6$ $\mu M/ml^{-1}/zi^{-1}$.

2) Încorporarea [$^3$H] adeninei este rapidă și este mai intensă la 90°C decît la 21°C sau la 50°C.

**Biomasa** acumulată este de 2—3 ori mai mare decît cea produsă de microorganismele fotosintetizante de la suprafață, în regiunea corespunzătoare habitatului analizat. Enright și colab. (1981) o apreciază, pe baza determinării ATP, la 100—250 $\mu$g C bacterian/l, ceea ce ar echivala cu 100—1 000 mg C.

Productivitatea bacteriană este mai mare în vecinătatea izbucurilor calde, unde emisiunea apei și a surselor reducătoare de energie chimică se face mai lent, ca și amestecul lor cu apa de mare oxigenată. Ea este mai mică în cazul izbucurilor fierbinți datorită proiectării brutale a jetului, care este diluat și dispersat rapid în coloana de apă. Acest fapt este confirmat și de prezența unei densități mai mari de animale în jurul izbucurilor calde decît în jurul celor fierbinți.

**Termofilia bacteriilor.** Majoritatea bacteriilor studiate sînt termofile sau ultratermofile.

Baross și Deming (1983) au anunțat cultivarea bacteriilor în condiții simulate în laborator la 250°C și 265 atm (condiții în care apa fierbe la 460°C), cu următoarele durate de generație: 8 ore la 150°C, 90 minute la 200°C și 40 minute la 250°C. Rezultatele sînt contestate, întrucît bacteriile ultratermofile uzuale cresc la maximum 120°C (temperatura optimă 105°C). În plus, s-a demonstrat că temperaturile superioare acestei limite, ca și presiunile mari au un efect de descompunere asupra compușilor organici.

Baross și colab. (1984) au semnalat prezența a $4{,}7 \times 10^5$ bacterii vizibile la microscop în apa fierbinte (304°C). Jannasch și Motte (1985), lucrînd în condiții în care a fost evitată orice diluție sau contaminare din mediu, nu au confirmat aceste rezultate pentru t° 338—350°C.

**Activitatea microbiotei hidrotermale.** În absența totală și permanentă a luminii, microorganismele utilizează compușii anorganici reduși din sursele hidrotermale ca sursă de energie pentru chemosinteze. Ele se comportă ca producători primari autentici*, care compensează absența produșilor rezultați din fotosinteză, utilizînd constituenții anorganici reduși ca sursă de energie pentru chemosinteză. Un rol primordial în acest proces revine bacteriilor sulfoxidante, datorită, pe de o parte, marii lor versatilități metabolice și, pe de alta, concentrației relativ mari a compușilor reduși ai S. În felul acesta, comunitățile animale din oazele submarine trăiesc pe seama producției primare chemosintetice și a energiei terestre și nu pe seama energiei solare.

**Alte activități microbiene posibile.** Deși compușii reduși ai S reprezintă donatorii majori de electroni, prezența bacteriilor metanogene, metilotrofe, sulf- și sulfat-reducătoare, hidrogen-oxidante și Fe- și Mn-oxidante sugerează posibilitatea intervenției lor în mediul hidrotermal.

*Bacteriile care oxidează metanul,* prezent în cantități mari, de origine geotermală, dar și biogenă (prin acțiunea *Methanococcus* sp.), utilizează $CH_4$

* Producția „primară" chemosintetică convențională este, în realitate, secundară pentru că depinde, în ultimă instanță, de cea fotosintetică. Energia geotermală este prezentă și în izvoarele termale terestre. În prezența fotosintezei însă, chemosinteza bacteriană asigurată de această energie contribuie nesemnificativ la producția primară globală.

în apropierea izbucurilor calde ca sursă atît de energie, cît și de C. Aerobe sau microaerofile, ele acționează după reacția: $2CH_4 + 2\,O_2 \rightarrow 2\,CH_2O + 2\,H_2O$.

*Bacteriile care oxidează* $H_2$ sînt facultativ autotrofe. Ele au avantajul ecologic de a putea combina proprietatea de creștere heterotrofă cu utilizarea enzimelor ciclului Calvin.

În creșterea autotrofă, ele utilizează $H_2$ produs pe cale geotermală, realizînd o producție primară de C organic după reacția netă:

$$6\,H_2 + 2\,O_2 + CO_2 \rightarrow CH_2O + 5\,H_2O$$

## Simbioza bacteriilor chemosintetizante cu nevertebratele marine

Densitatea celulelor bacteriene în vecinătatea izbucurilor hidrotermale nu explică abundența neobișnuită a celor două specii majore de nevertebrate: *Riftia pachyptila* și *Calyptogena magnifica*.

În absența unei surse alternative de nutrienți, Boss și Turner (1980) au emis ipoteza unui transfer foarte eficient de C organic produs pe cale simbiotică de *R. pachyptila*. Ipoteza a fost confirmată prin cercetările efectuate pe *R. pachyptila*, vierme vestimentifer, lung de ~ 2,5 m și gros de 5 cm, care formează adevărate „tufișuri" înalte de 1—2 m în jurul surselor termale cu temperatura de 20—30°C. Branhiile reprezintă singura parte a viermilor care iese din tubul care îi înconjură. Ei pot reintra în acesta în condiții nefavorabile. Branhiile sînt scăldate de apa de mare oxigenată, bogată în sulfuri, și pot transmite compușii necesari pentru sinteza chimică ($CO_2$, sulfuri) direct în sistemul circulator (viermele fiind lipsit de capacitatea de ingestie și de digestie).

Feldeck (1981) a demonstrat că ~ 50—60% din capacitatea corpului lor este ocupat de un organ specializat cu „potențial chemoautotrof" — *trofosomul* — cu țesut spongios, reprezentînd o adaptare structurală și fiziologică menită să adăpostească simbionții bacterieni.

Deși nu au fost izolați și cultivați, natura procariotă a simbionților este sugerată de morfologie (forme sferice sau de bastonașe scurte), de mărimea genomului, de raportul de baze (G + C%), ca și de activitățile enzimatice (Jannasch și Taylor (1984). Datorită lor, trofosomul dispune de enzime cu rol în producerea și stocarea de energie pe cale biologică (ATP), de enzimele ciclului Calvin-Benson și de unele enzime din ciclul N și S. Enzimele respective sînt absente în restul țesuturilor. Simbioza implică absorbția $H_2S$ eliminat din izbucurile termale, a $O_2$ și $CO_2$ dizolvate în apa de mare și transportul lor pe cale sanguină la trofosom (fig. 278).

Procesul este facilitat de existența unei hemoglobine extracelulare, care circulă liber în sînge. Ea este o moleculă neobișnuit de mare (2 000 kdal), avînd o funcție complexă datorită prezenței în structura sa a două situsuri de legare: unul pentru $O_2$ și celălalt pentru $H_2S$. Ea asigură transportul eficient al $O_2$ și $H_2S$ la trofosom, împiedică atît oxidarea spontană, cît și reacția dintre cele două gaze și exercită o funcție protectoare prin blocarea $H_2S$ (care ar putea fi toxic pentru bacterii și țesuturi și ar putea inhiba reacțiile enzimatice). $CO_2$ este transportat în stare liberă la trofosom. Acesta conține ~ $10^9$ bacterii/$cm^3$, aparținînd grupurilor sulfoxidante și metanoxidante (ceea ce sugerează și posibilitatea chemosintezei prin asimilarea metanului).

$H_2S$ furnizează energia și puterea reducătoare necesare pentru asimilarea de către bacterii a $CO_2$ dizolvat în apa de mare la C organic. Ca rezultat al activității bacteriene, celulele de la periferia trofosomului eliberează în sînge C organic, sulfat și tiosulfat. În felul acesta se realizează transferul direct de materie și energie de la producătorul primar (bacterian) la consumatorul primar (viermele vestimentifer).

Originea și evoluția simbiozei nu sînt cunoscute. Nu se știe dacă embrionii de *Riftia* sînt sterili sau nu, sau dacă preiau bacteriile corespunzătoare dintr-un mediu bogat în $H_2S$ sau metan. Descoperirea trofosomului a determinat o revizuire a modului de nutriție a filumului *Pogonophora* în sensul că toate speciile investigate pînă în prezent conțin bacterii chemosintetizante simbiotice, care utilizează diferiți compuși chimici reduși. Simbioza furnizează o sursă de hrană tot atît de eficientă ca și fotosinteza sau chiar mai importantă, deoarece realizează transferul nutrienților foarte direct în sistemul circulator închis, funcționînd ca un lanț trofic scurt-circuitat.

Mecanisme simbiotice similare, dar mai simple, funcționează și la bivalve ca *Bathymodulius thermophilus* sau *Calyptogena magnifica* la care bacteriile sulfoxidante și metanoxidante sînt localizate în celulele branhiilor.

Modalități particulare de nutriție mediată de bacterii au fost evidențiate la *Alvinella pompejana* și *A. caudata*.

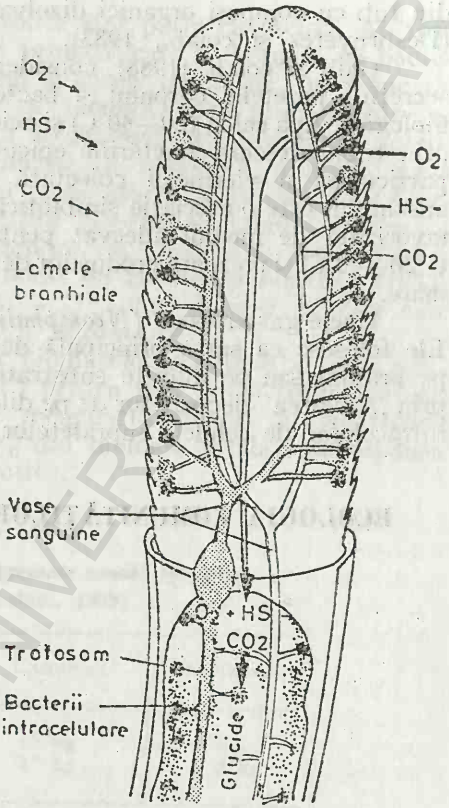



Fig. 278. — Asociația dintre bacteriile simbiotice și *Riftia pachyptila*. Viermii, ale căror branhii sînt scăldate de apa rezultată din amestecul lichidului hidrotermal cu apa de mare bine oxigenată, asigură vehicularea compușilor minerali ($CO_2$, sulfuri etc.) necesari pentru chemosinteză, pe calea sistemului lor circulator spre bacteriile simbiotice localizate în țesutul foarte bine irigat al trofosomului. Substanțele organice sintetizate de bacterii sînt preluate de *R. pachyptila*, iar metaboliții rezultați ($CO_2$ respirat, compușii azotați etc.) sînt reutilizați de bacterii (după Laubier și Desbuyrères, 1984).

*A. pompejana* („viermele de Pompei") este un anelid polichet asociat cu craterele „fumegătorilor albi" în jurul cărora formează colonii cu structuri asemănate cu bulgării de zăpadă. Suportă temperaturi de 30—40°C la periferia coloniei. În masa tubulilor care formează colonia t° ajunge la 250°C. Gradientul termic foarte mare ilustrează un proces intens de amestec al lichidului termal cu apa de mare. Ei nu conțin bacterii endocelulare, ci numai un număr mare de bacterii cocoide sau filamentoase epibiontice implicate în metabolismul sulfului localizate pe suprafața dorsală a corpului și la nivelul parapodiilor posterioare. În plus, bacteriile îmbogățesc lichidul

din tub cu compuși organici dizolvați, favorizînd absorbția transepidermică (Desbruyères și colab., 1983).

Gaill și colab. (1988) consideră că viermele, tubul său format prin secrețiile peretelui corpului și bacteriile asociate funcționează ca o unitate biologică. Apa caldă (20—40°C) și acidă, care conține puțin $O_2$ dizolvat circulă prin tubul deschis. Bacteriile epicuticulare chemosintetice reprezintă hrana particulară a viermelui colectată prin tentaculele bucale protractile. În ansamblu, este o asociație simbiotică complexă polichete/bacterii epibiontice, favorizată de mediul adecvat pentru chemosinteză (abundența sulfurilor, t° 20—40°C) și prezența produșilor de metabolism ai viermelui în concentrație mare.

Unele gasteropode *(Neomphalus pretterae)* au o nutriție mai complexă. Ele folosesc ca sursă principală de nutrienți bacteriile filamentoase fixate pe branhii sau pe diferite substrate. Bacteriile sînt capturate prin filtrare, prin „raclarea" depozitelor de pe diferite substrate sau endocitate și digerate intracelular de celulele suprafețelor epiteliale (Laubier, 1989).

## ECOLOGIA COMUNITĂȚILOR HIDROTERMALE SUBMARINE

**„Datorită simbiozei dintre bacteriile chemolitotrofe și nevertebrate, comunitățile biologice din jurul izbucurilor hidrotermale și din mediul mai rece înconjurător sînt singurele sisteme biologice de pe Planeta noastră, cunoscute ca dependente integral de energia provenită din căldura internă, cu origine radioactivă, și singurele care ar putea supraviețui atît timp cît există apa, în absența soarelui. Acest fapt este de un interes teoretic deosebit pentru ecologie".**

L. LAUBIER

Datele acumulate pînă în prezent demonstrează, fără echivoc, că bacteriile chemosintetizante stau la baza unui lanț trofic care permite dezvoltarea abundentă a unor populații de nevertebrate, adaptate specific pentru a crește în imediata vecinătate a surselor hidrotermale submarine. Este un fenomen absolut original din punct de vedere ecologic prin totala sa independență de energia solară. Deși concentrate pe suprafețe limitate în spațiu, aceste comunități se dezvoltă foarte eficient, beneficiind de funcția de producători primari a bacteriilor care asigură transformarea energiei geochimice sau geotermale în energie chimică utilizată pentru producerea de C organic. Rezultatul acestei activități este producerea unei biomase extrem de bogate, variind între 10 și 100 kg/m² greutate umedă, din care numai *Riftia* poate furniza 10—15 kg/m². Această situație contrastează evident cu lipsa sau cu prezența foarte limitată a organismelor bentonice, datorită lipsei de nutrienți proveniți din sedimentarea particulelor foarte mici din zonele eufotice (biomasa normală la adîncimea de 2 500 m oscilează între 0,1 și 10 g/m²).

Interacțiunile din cadrul rețelei trofice sînt puțin cunoscute. Au fost identificate unele organisme-consumatori primari, care se hrănesc cu bacteriile depuse pe suprafața rocilor, precum și altele (polichete, anemone de mare, *Bathypecten* etc.), mai abundente ca biomasă decît primele, care se hrănesc fie cu materia organică provenită de la producătorii primari simbiotici, fie cu bacterii libere. Au fost identificate, de asemenea, și cîteva organisme carnivore ca decapodele *Bythograea thesmydon* și peștii zoarcizi *(Thermarces* și *Pachycara)* ce se hrănesc cu *Riftia*, precum și crabul *Cyanagraea praedator*, care se hrănește cu *A. pompejana*, *A. caudata* și *Paralvinella*.

Primul model de rețea trofică elaborat de Hessler și Smithey (1983) pentru regiunea Galapagos consideră că ~ 75% din biomasa oazelor este asigurată de specii purtătoare de bacterii simbiotice.

Fustec și colab. (1988) au comparat biomasele acumulate în două situsuri diferite (unul „cald" și altul „rece") pentru trei nivele trofice principale (consumatori primari, consumatori secundari-carnivori și detritivori) (tabelul nr. 56). Ei apreciază că ~ 90% din biomasa totală este produsă de organisme care conțin bacterii simbiotice.

*Tabelul nr. 56*

**Biomasa la trei nivele trofice (greutate umedă/100 m²)**
(după Fustec și colab., 1988)

| Situsul | Consumatori primari | Carnivori | Detritivori |
|---|---|---|---|
| Pogosud | 800 kg | 45 kg | 8 kg |
| Actinoir | 220 kg | 17 kg | 2,8 kg |

Nu se știe în ce măsură comunitățile rețelei trofice hidrotermale exportă o parte din producția lor în mediile apropiate, eventual prin intervenția unor carnivore mari. După Jannasch (1985), precum și după Laubier (1989), considerente ecologice de ordin teoretic nu exclud posibilitatea existenței unor mecanisme de dispersie a materiei și a energiei din regiunile foarte productive la cele foarte oligotrofe ale fundului oceanului.

Ținînd seama de caracterul efemer al celor două sisteme, viu și neviu, asociate, cu aceeași durată de existență, se pune problema modului în care sînt colonizate noile situsuri active, atît de animale (relativ sedentare), cît și de microorganisme. Diseminarea pare să fie asigurată mai ales de stadiile larvare ale nevertebratelor, care pot fi purtate de curenții de adîncime ce au, uneori, viteze relativ mari (10—20 cm/s). Nu este exclusă nici participarea unor specii animale mai mari și mai mobile.

Chemosinteza bacteriană pare să aibă un rol mai important decît i s-a atribuit pînă în prezent în economia mediului marin (Laubier și Desbruyères, 1984; Laubier, 1989). Asociația bacteriilor chemosintetizante cu diferiți consumatori primari a fost evidențiată în sedimentele profunde din fiorduri, în zonele de vărsare în mare a marilor emisari urbani, a mangrovelor*. În

* Mangrove = comunități de arbori și arbuști, în special din genul *Rhizophora* avînd frecvent rădăcini adventițiale aeriene. Sînt prezente în mlaștinile cu apă sărată sau în apropiere de litoralul marin expus mareelor în regiunile tropicale sau subtropicale.

aceste zone, la interfața dintre sedimentele reducătoare și apa de mare trăiesc nevertebrate care conțin bacterii chimiosintetizante simbiotice. Utilizînd $^{14}CO_2$, Sîrbu, Popa și Goliat (1990) au evidențiat existența unei producții primare chemosintetice în peștera Movile, din sudul Dobrogei. Lipsită de o ieșire naturală, peștera este populată de o faună terestră și acvatică neobișnuită, dezvoltată pe baza utilizării ca sursă de energie a $H_2S$ din apa sulfuroasă termominerală.

### Evoluția ecosistemelor hidrotermale

Izbucurile submarine au o durată limitată de funcționare, apreciată, pe baza studiilor de datare a craterelor inactive cu Pb 210, la 23—61 de ani.

Odată cu încetarea activității lor, dispar și comunitățile biologice a căror existență este strict legată de fenomenele fizico-chimice generate de mediul hidrotermal. Datele privind longevitatea bivalvelor gigante (obținute prin studiul cochiliilor rămase pe locul vechilor oaze) confirmă o durată de viață egală cu cea a izbucului inactiv.

După Larbaud (1989), din punct de vedere geologic, izbucurile hidrotermale sînt sisteme foarte vechi pe planetă. Datele mineralogice și probele fosilifere obținute din studiul unor izbucuri demonstrează existența lor în depozite de sulfuri din cretaceu (Haymon și Koske, 1985). Prezența viermilor pogonofori caracteristici zonelor hidrotermale în matrice de sulfuri de Zn și Fe a fost evidențiată în unele zone submarine din Cipru și sultanatul Oman. Deși unii cercetători au descris fenomene similare în unele zăcăminte din carbonifer (350 milioane de ani) în Islanda, Larbaud consideră că extinderea istoricului acestor fenomene dincolo de cretaceu necesită cercetarea în continuare a fosilelor și a altor probe de viață din depozitele hidrotermale din paleozoic și precambrian.

În timp ce vechimea ecosistemelor hidrotermale este discutabilă, se pare că există un acord în ceea ce privește existența izbucurilor ca fenomene geologice care s-au schimbat foarte puțin de-a lungul a patru miliarde de ani. Ele ar fi funcționale încă din archaean.

### Mediul hidrotermal și originea vieții

Mediul hidrotermal are cîteva particularități care ar putea corespunde unui sediu posibil pentru originea vieții. El oferă o sursă de C, expusă la temperaturi mari, în condiții reducătoare, și principalele elemente biogene sub formă de $H_2$, N anorganic, $H_2S$, CO și posibil $CH_4$. Întregul sistem a fost protejat de efectele distructive ale radiațiilor UV, ca și de impactul meteoriților de către oceanul supernatant.

Corliss și colab. (1981) au subliniat rolul direct al interacțiunilor dintre activitatea hidrotermală, ocean și atmosferă în crearea diferitelor gradiente fizice și chimice, și posibilitatea apariției unor căi multiple de sinteză abiotică a unor compuși chimici, care stau la baza originii și evoluției precelulelor și, final, a organismelor vii.

Ulterior, Milker și Broda (1988) au demonstrat experimental că apa supraîncălzită la t° care depășesc 300°C mai degrabă determină distrugerea compușilor organici cu structură complexă decît să favorizeze sinteza lor.

Cu toate acestea, Wächtershäuser, citat de Horgan (1991), a formulat o ipoteză pur speculativă, agreată, totuși, de Woese, Pace ș.a. El consideră

că viața a apărut ca un proces metabolic, respectiv ca o reacție chimică ciclică, dirijată de o anumită sursă de energie. Acest proces a avut loc pe o suprafață solidă foarte specifică — pirita — mineral metalic ($FeS_2$) foarte răspîndit în jurul izbucurilor hidrotermale. Ea are o suprafață încărcată pozitiv, de care pot fi legați diferiți compuși organici simpli. Formarea continuă a piritei de la Fe și S produce energie — sub formă de electroni — care determină compușii organici să reacționeze între ei și să crească în complexitate. Prima ,,celulă'' a fost, probabil, un grăunte de pirită, închis într-o anumită ,,membrană'' de compuși organici. ,,Celula'' s-a reprodus dacă grăuntele de pirită a format, prin creștere, un cristal, care a ,,înmugurit'', a devenit încapsulat într-o membrană proprie și s-a desprins liber.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# MICROBIOTA NORMALĂ A ORGANISMELOR ANIMALE

„Mamiferele și animalele aparținînd celor mai multe specii (dacă nu tuturor speciilor) pot fi considerate ca ființe formate din celule eucariote animale, în simbioză cu celulele microbiene procariote și eucariote. Altfel spus, animalele există ca unități organice complexe alcătuite din celule animale și microbiene care interacționează".

D. C. SAVAGE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# MICROBIOTA NORMALĂ A ORGANISMELOR ANIMALE

„Sub raportul capacității lor de a aduce beneficii sau de a fi dăunătoare, microorganismele indigene nu pot fi considerate în termeni absoluți. În funcție de anumite circumstanțe, fiecare component al microbiotei rezidente poate avea capacitatea de a ajuta sau de a aduce prejudicii gazdei".

P. A. MACKOWIAK

Deși organismele animale sînt sterile în cursul vieții intrauterine, imediat după naștere sînt colonizate progresiv de un număr mare de microorganisme, care pot fi întîlnite pe diferitele suprafețe ale corpului, ca și în sistemul digestiv. Numărul lor la omul adult este apreciat la $10^{14}$ (o sută de mii de miliarde) de celule, din care cea mai mare parte sînt localizate în sistemul digestiv (Luckey, 1972; Moore și Holdman, 1974). Pentru comparație, menționăm că numărul total al celulelor organismului uman este de $10^{13}$ (Dobzhansky, 1971), ceea ce reprezintă numai 10% din cel al microorganismelor.

Microorganismele asociate cu organismele animale aparțin la două categorii majore:

1) **Microbiota normală** (Dubos, 1956) sau **asociată** este reprezentată de microorganismele indigene sau autohtone, respectiv din specii a căror asociere cu un anumit animal a fost stabilită în cursul evoluției comune. În consecință, ele sînt întîlnite datorită caracterului lor ubicvitar la majoritatea membrilor comunității animale. Este reprezentată de bacterii, microfungi și protozoare. Deși de la copii sănătoși au fost izolate și cultivate mai multe virusuri, Reed și Tyrrell (1974) consideră că nu există o „microbiotă" virală normală.

Savage (1977, 1986) propune următoarele criterii pentru identificarea microorganismelor autohtone și deosebirea lor de cele „străine":

a) prezența constantă la organismele convenționale, normale;

b) colonizarea habitatelor lor, succesiv, la animalele tinere;

c) colonizează anumite regiuni particulare ale organismului;

d) se mențin la nivele stabile de densitate în comunitățile de climax la animalele adulte;

e) în cazul celor din sistemul gastrointestinal, pot să crească anaerob și să se asocieze intim cu epiteliul mucoaselor în regiunile colonizate.

2) **Microorganismele străine sau alohtone,** care pot fi găsite în orice habitat normal, provin din mediul extern, respectiv din aer, sol, alimente sau de la alte animale. Unele dintre ele pot fi patogene. Frecvent sînt numai în tranzit, fără să contribuie semnificativ la activitățile ecosistemului, la ale cărui condiții nu se pot adapta. Un microorganism alohton se poate localiza într-o nișă eliberată de un autohton numai dacă aceasta este pertur-

bată și adusă la o condiție anormală. Cînd sistemul revine la normal, microorganismul autohton își reocupă nișa, eliminînd specia alohtonă. Capacitatea microorganismelor alohtone de a coloniza un anumit habitat și de a se multiplica în el numai în circumstanțe anormale reprezintă, după Savage (1977), distincția fundamentală dintre ele și autohtone.

O situație particulară este întîlnită în cazul microbiotei gastrointestinale: un microorganism poate fi autohton pentru un anumit habitat și alohton pentru altul, pe care îl tranzitează, după ce s-a desprins de habitatul său natural. Astfel, un microorganism din colon poate fi alohton, dacă provine de la nivelele superioare (gură, stomac, intestin subțire) sau chiar de la nivelele inferioare colonului (în cazul animalelor coprofage).

## COLONIZAREA ȘI SUCCESIUNEA MICROORGANISMELOR LA OM

Colonizarea microbiană a tuturor suprafețelor externe și a unora interne ale organismului începe la naștere și are ca rezultat instalarea microbiotei normale. Procesul este, de regulă, benefic atît pentru microorganisme, cît și pentru gazdă, în sensul că fiecare furnizează ceva esențial celuilalt și primește în schimb ceva esențial.

Fătul steril *in utero* se infectează în cursul trecerii prin vagin și genitalele externe materne și de la orice altă sursă din mediu la care este expus. Inițial, colonizarea este fortuită și dependentă de primele microorganisme întîlnite, de calea de naștere, de cantitatea de vernix caseosa prezentă la naștere, de tipul de hrănire (la sîn sau artificial), de gradul de expunere la mediul spitalicesc etc. (Mackowiak, 1982; van der Waaij, 1989). Un rol important revine, deci, microorganismelor provenite de la organismul matern, contacților umani și, progresiv, celor dintr-un număr tot mai mare de factori din mediu. Ca urmare, după cîteva săptămîni, organismul nou-născutului este populat de o microbiotă asemănătoare ca specii celei a adultului sănătos.

În cursul acestui proces, multe din microorganismele contaminante mor și dispar, deoarece nu se pot adapta, iar altele sînt îndepărtate de substanțe antimicrobiene. Totdeauna există unele specii-pionier care se stabilizează, aderă la diferite substraturi sau se divid cu o viteză mai mare decît cea de eliminare, colonizînd diferitele habitate pînă cînd, practic, toate sînt ocupate de microorganismele corespunzătoare.

Succesiunea evoluează după o secvență caracteristică, variabilă în funcție de natura animalului, de dieta la care este supus etc.

*La om*, în cazul sugarilor hrăniți la sîn, primele bacterii care apar în sistemul digestiv aparțin genului *Lactobacillus*, urmat după 1—2 zile de *Bifidobacterium*, care devine predominant numeric. Ulterior se instalează, treptat, alte specii, începînd cu bacteriile facultativ anaerobe ca *E. coli* și *Streptococcus faecalis*.

Modificarea majoră a microbiotei la toate animalele studiate este asociată cu tranziția la alimente solide. Apar bacteriile strict anaerobe (*Bacteroides* sp.), mai ales în intestinul gros, în timp ce numărul celor facultativ anaerobe scade progresiv. În momentul înțărcării, populațiile climax conțin

un număr redus de microorganisme facultativ anaerobe, care este menținut ca atare, dacă nu apar procese severe de perturbare a ecosistemului.

Modul de instalare a microbiotei complexe, tipică pentru om, nu este cunoscut, deoarece mecanismele care modulează implantarea bacteriilor sînt încă nedescifrate. Situația este complicată de faptul că evenimentele succesionale sînt asociate cu interacțiuni complexe între diferitele tipuri de microorganisme, între microorganisme și gazdă, și sînt influențate de dietă, de mediu, precum și de modificările, greu de evaluat, legate de vîrstă. Oricum, final se realizează o comunitate de climax a cărei structură depinde atît de factori care țin de gazdă, cît și de microorganisme. În cazul sistemului digestiv, cel mai mult studiat, ea ocupă habitate de-a lungul acestuia, pe verticală, de la esofag la anus, și pe orizontală, din centrul lumenului pînă în adîncimea criptelor mucoasei (Savage, 1977, 1986). Orice probă examinată conține atît microorganisme autohtone, cît și microorganisme alohtone provenite din ingestie sau din habitate superioare celui studiat.

**Mecanismele colonizării microorganismelor** sînt relativ puțin cunoscute. Ele trebuie să învingă numeroase obstacole diferite în funcție de natura habitatelor respective. Între acestea sînt de menționat sistemele de eliminare mucociliare, care îndepărtează bacteriile nelegate de epitelii, fluxul unidirecțional al lichidelor pe suprafața celulelor epiteliale și activitatea peristaltică (în cazul sistemului digestiv), procesul de îndepărtare (turnover) periodic al celulelor epiteliale senescente, rolul sistemelor imunitare locale, variațiile pH și ale potențialului de oxidoreducere, agenții antimicrobieni nespecifici ai gazdei, competiția cu alte microorganisme etc.

În ultimii ani s-a semnalat existența unei anumite înrudiri imunologice între microorganisme și mucusul sau mucoasa intestinală în care ocupă în mod normal un habitat. Astfel, Too și Lee (1974) au semnalat existența unor similarități antigenice între microorganismele din intestin și celulele gazdei, sugerînd o strînsă înrudire imunologică, derivată din evoluția lor comună. Cel puțin suprafața microorganismelor care vine în contact cu celulele gazdei este suficient de înrudită cu antigenele acestora, încît pot fi recunoscute ca proprii („self") de sistemul imunitar al gazdei, ceea ce constituie un avantaj mare pentru colonizarea habitatelor respective (Savage, 1971, 1986). În sfîrșit, Hoskins și Boulding (1976) au arătat că bacteriile izolate din fecalele oamenilor care secretă glicoproteine specifice de grup sanguin diferă ca tip antigenic în funcție de tipul secretor al persoanei purtătoare.

**Factorii favorizanți ai colonizării.** Capacitatea microorganismelor de a adera de suprafața celulelor epiteliale ale unei anumite specii animale reprezintă un determinant critic al posibilității lor de a coloniza specia respectivă. Ea împiedică, pe de o parte, expulzarea lor și, pe de alta, le stimulează creșterea și multiplicarea, datorită tendinței nutrienților și altor macromolecule de a se concentra la interfața solid/lichid.

Aderența are un caracter de specificitate, în sensul că epiteliile situate în diferite localizări anatomice au capacități de legare a unor bacterii diferite, corespunzător celor caracteristice habitatului respectiv. La baza aderenței bacteriilor stă, de regulă, legarea adezinelor bacteriene — lectinele specifice pentru specie — de receptorii complementari de pe suprafața celulelor epiteliale ale gazdei. Frecvent, ele sînt reprezentate de proiecții filamentoase de tipul fimbriilor, care se leagă de receptorii glicoproteici sau glicolipidici de pe suprafața epiteliilor (Mackowiak, 1982).

Microorganismele cu capacitate redusă de colonizare directă a unui anumit tip de celulă epitelială sau de substrat sînt favorizate să o facă prin agregarea lor prealabilă sau prin sinteza unor substanțe specifice. Astfel, glicoziltransferaza, produsă de *Streptococcus salivarius*, facilitează legarea de suprafețele netede ale unor bacterii normal puțin aderente, cum este *Veillonella* (Wittenberger și colab., 1977).

Adeziunea trebuie să învingă mecanismele gazdei ce se opun acestui fenomen, apărute în cursul evoluției paralel cu cele care îl favorizează. Cele mai importante sînt:

1) producerea de IgA de secreție (sIgA);
2) sinteza de lizozim care inhibă aderența;
3) sinteza de analogi de receptori specifici, care se combină cu suprafețele de legare, neutralizîndu-le capacitatea de adeziune.

Se adaugă rolul unor factori accesorii de inhibare a aderenței:

a) efectul antibacterian al bilei neconjugate care explică numărul mic al bacteriilor din intestinul subțire;

b) producerea de către gazdă a unor proteine care leagă Fe, creînd un deficit de Fe pentru bacterii;

c) existența unor situsuri anatomice convenabile pentru unele microorganisme și nefavorabile (pH, potențial redox) pentru altele.

## HABITATELE MICROBIOTEI GASTROINTESTINALE

Ecosistemul gastrointestinal este complex, deschis, integrat și format din unități care interacționează și care conțin mai multe habitate pentru microorganisme (Savage, 1987).

În mod normal, la organismele adulte, fiecare din aceste habitate este colonizat de mai multe specii de microorganisme autohtone sau indigene. Fiecare specie ocupă o nișă în habitat și contribuie la economia întregului sistem. Microorganismele pot apărea în orice regiune majoră a sistemului digestiv, de la esofag la anus, în habitate cu dimensiuni vizibile sau microscopice (microhabitate). Ele pot avea trei localizări:

1) *Lumenul* oricărei regiuni poate fi considerat ca habitat în măsura în care microorganismele pot coloniza materialele prezente în el. În cele mai multe cazuri, habitatul adevărat al microorganismelor din lumen este reprezentat de suprafața particulelor de materiale solide, cum ar fi cele ale constituenților alimentari în curs de digerare. În general, lumenul poate fi colonizat în special în regiunile de stază relativă (ca în cecum și intestinul gros) unde viteza de flux a conținutului intestinal nu depășește viteza de divizare a microorganismelor.

2) *Suprafața epiteliului* din oricare dintre regiunile tubului digestiv poate fi populată de comunități de microorganisme diferite, în funcție de localizarea regiunii respective și de particularitățile sale fizico-chimice.

3) *Criptele mucoaselor*, prezente mai ales în intestinul subțire inferior, cecum și colonul anumitor specii animale.

Fiecare din aceste trei tipuri de localizări este asociată cu anumite tipuri de bacterii.

### Microbiota gastrică

Considerat, în general, ca steril, stomacul animalelor convenționale poate conține microorganisme ingerate odată cu alimentele și apa. Acest fenomen este foarte accentuat la animalele coprofage (rozătoare, porc etc.), care pot ingera zilnic cantități imense de microorganisme alohtone provenite din fecale. Pentru a fi considerate ca semnificativ prezente în stomac, microorganismele trebuie să fie găsite la mai multe persoane analizate și să depășească densitatea de $10^3$ celule/ml.

Odată ajunse în stomac, marea majoritate a microorganismelor sînt distruse de aciditatea conținutului stomacal și de enzime sau sînt transferate rapid în intestinul subțire.

Ca și în cazul altor segmente ale sistemului digestiv, microorganismele se pot asocia cu epiteliul secretor columnar al mucoasei stomacale, de care pot fi desprinse cu dificultate. De aceea, numărul lor este, în acest caz, inferior celui real. La om, din conținutul gastric au fost izolate, cel mai frecvent, microorganisme acido-tolerante, ca specii de *Lactobacillus* sp., *Candida* și *Torulopsis*. În număr mai mic au mai fost semnalate: *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Actinobacillus coliforme* ș.a.

După cercetări mai recente se consideră că, în general, datele privind microbiota gastrică subestimează existența și impactul său asupra digestiei. De altfel, încă din anul 1978, Savage a demonstrat că *Torulopsis pintopolesii* se asociază cu suprafața epiteliului secretor gastric, formînd straturi pluricelulare evidențiate prin microscopie în scanning.

### Microbiota intestinului subțire

Acest segment oferă cel puțin trei regiuni majore cu condiții de mediu schimbate, corespunzînd segmentelor anatomice duoden, jejun și ileon, respectiv superior, mijlociu și inferior. În general, aceste regiuni au o microbiotă redusă numeric, deoarece, în condiții normale, creșterea bacteriilor în intestinul subțire este limitată. În duoden și jejun a fost evidențiat un număr mic de specii *(Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. și *C. albicans)*, unele derivate în mod cert din cavitatea bucofaringiană.

Numărul poate să crească mult în anaclorhidrie și alte stări patologice. Numărul microorganismelor este mai mare în ileon unde pot fi găsite și bacterii provenite din colon. Dintre speciile întîlnite în densități semnificative ($> 10^3$/ml) sînt de menționat cele aparținînd genurilor: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Actinobacillus*, cărora li se adaugă coliformi și bacili anaerobi Gram-pozitivi. Unele trec cu hrana în curs de digestie și provin din habitate superioare sau chiar de la exterior.

Între factorii care limitează prezența și multiplicarea bacteriilor în intestinul subțire cei mai importanți ar putea fi:

1) aciditatea gastrică;

2) peristaltismul, care asigură tranzitul relativ rapid spre intestinul gros. Ca probă, în ileonul distal, unde conținutul devine pentru o perioadă de timp static, este colonizat și lumenul său;

3) existența unor substanțe care inhibă creșterea microorganismelor.

### Microbiota intestinului gros

Rezervorul major de microorganisme, intestinul gros conține o comunitate microbiană extrem de complexă alcătuită, la cele mai multe mamifere, inclusiv la om, din cîteva sute de specii bacteriene intolerante la $O_2$, dintre care numai puține au fost cultivate *in vitro* și identificate. Include și microorganisme alohtone, al căror număr este semnificativ dacă depășește $10^6$ bacterii/g de conținut intestinal. Microorganismele alohtone sînt provenite din alimente sau din habitate cu localizare în segmentele superioare ale sistemului digestiv. Aflate în tranzit, ele sînt nesemnificative numeric și funcțional comparativ cu populațiile stabile.

La om, numărul bacteriilor strict anaerobe este $> 10^{10}$ celule/g. Bacteriile metanogene sînt prezente doar sporadic. Din numărul total al bacteriilor viabile, contrar datelor mai vechi, coliformii reprezintă numai 0,1—1%. Colonul omului normal nu conține protozoare (Wolin, 1981). Numărul bacteriilor atinge densități enorme, în special, în zonele de stagnare relativă a conținutului intestinal, din cauza tranzitului lent care permite multiplicarea lor. În plus, un număr important de bacterii sînt legate de celulele epiteliale ale mucoasei sau chiar inclavate între acestea.

Hungate (1978) insistă asupra rolului potențial al bacteriilor intestinale în patologie. El se poate manifesta mai mult sau mai puțin brusc prin tulburări intestinale.

Microbiota colonului poate determina complicații severe cînd integritatea peretelui intestinal este compromisă (apendicite, diverticulite, infecții postoperatorii etc.). În plus, ea poate favoriza bacteriile coliforme, cu rol în infecțiile genito-urinare. Membranele celulare sînt extrem de permeabile la $NH_3$ produs de unele microorganisme și toxicitatea lui cronică poate fi un factor important în geneza bolilor colonului. Fermentarea fibrelor vegetale diminuă toxicitatea unei părți din $NH_3$ la $NH_4$.

Un efect mai subtil, prin caracterul său insidios, care face greu de analizat relația cauză — efect, este implicarea posibilă, indirectă, a microbiotei în cancerul de colon. Incidența acestuia, ca și a bolilor colonului în general, este mult redusă la populațiile care consumă multe fibre vegetale comparativ cu cele care au un regim bogat în grăsimi și proteine.

### Microbiota fecalelor

Materiile fecale reprezintă, după Savage (1977), un habitat complex cu un număr imens de nișe, care pot fi ocupate de microorganisme. Complexitatea sa decurge din faptul că formarea nișelor implică participarea unor procese biochimice complexe care interacționează într-un mod puțin cunoscut. Unele sînt inițiate înainte de ingestie, prin multiplicarea microorganismelor în alimente și continuate în toate segmentele sistemului digestiv, prin acțiunea enzimelor produse de gazdă și prin intervenția numărului imens de microorganisme diferite și al fenomenelor de deshidratare și concentrare din colon etc.

Wolin (1981), precum și Lee (1985) apreciază numărul bacteriilor în fecale la $\sim 1 \times 10^{11}$/g greutate umedă. După Stephan și Cummins (1980), omul adult normal hrănit cu carne și puține fibre vegetale excretă zilnic în $\sim 120$ g fecale, $\sim 1{,}2 \times 10^{13}$ bacterii (16,0 g celule bacteriene/greutate uscată), microorganismele reprezentînd 40—50% din masa fecalelor. Ele

aparțin la peste 400 de specii, din 40 de genuri diferite. Numeroase specii depășesc densitatea de $10^9$ celule/g. Între acestea sînt frecvent izolate următoarele: *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* sp., *Propionibacterium*, *Succinivibrio*, *Bacteroides* sp., *Catenabacterium* sp., *Eubacterium* sp., *Butyrivibrio*, *Acidoaminococcus*, *Proteus* sp., *Megasphaera*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, coliformi etc. Inconstant, au fost evidențiate specii de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* etc. În cele mai multe cazuri, densitatea speciilor strict anaerobe depășește numărul de 10 miliarde celule/g greutate uscată materii fecale.

Compoziția fecalelor în microorganisme este revelatoare pentru cea a comunităților din lumenul colonului. Ea nu reflectă însă natura bacteriilor localizate pe epiteliul colonului și în criptele mucoasei.

### Relația dintre structura sistemului digestiv și microbiota normală

Structura sistemului digestiv determină principalele localizări ale microbiotei normale și în oarecare măsură compoziția și interacțiunile ce au loc în cadrul ei. Ea este influențată de mediu, de natura alimentelor, de animalul însuși și de numeroasele specii de microorganisme care îl pot coloniza. Practic, sistemul digestiv al mamiferelor include cel puțin cinci regiuni majore: esofag, stomac, intestin subțire, cecum și intestinul gros, care, în funcție de specia animală, pot fi divizate în mai multe regiuni.

În funcție de structura sistemului digestiv au fost descrise trei tipuri de habitate, care oferă microorganismelor colonizatoare condiții diferite de mediu și, în consecință, modalități diferite de utilizare a hranei (Hungate, 1978).

1) Tipul „tub drept" — caracteristic mamiferelor carnivore, omnivore și insectivore — corespunde unei hrane predominant de origine animală, ușor de digerat, reprezentată, în special, de proteine, glucide și lipide, adesea asociate sub formă de concentrate, digerabile atît de enzimele animalelor, cît și de microorganisme.

Caracteristica fundamentală este legată de existența unui stomac foarte acid, care limitează multiplicarea microorganismelor ce se dezvoltă progresiv, pe măsură ce secrețiile alcaline restabilesc un pH favorabil. Digestia este realizată de enzimele gazdei cu producere de aminoacizi, glucide solubile etc., care, în majoritate, sînt absorbite și numai o mică parte sînt preluate de microorganisme. Bolul de alimente este transferat de-a lungul tubului digestiv și ajunge la locul digestiei și absorbției înainte ca microorganismele să se multiplice cu intensitate maximă.

Relația nutrițională majoră dintre microorganisme și animale este considerată de Hungate (1978) ca fiind cea de *competiție*.

*Animalele ierbivore*, care se hrănesc cu alimente de origine vegetală, în care predomină celuloza, hemicelulozele, pectinele, lignina etc., nedigerabile de către gazdă și numai cu cantități mici de proteine, lipide și glucide prezintă tipuri de microbiotă particulare.

2) Rumegătoarele sînt caracterizate prin prezența unei camere de fermentație, deviată de la linia de trecere a alimentelor, precedînd stomacul propriu-zis — rumenul (caracteristic pentru *Bovidae* și *Ovinae)* sau situată „în linie", sub forma unei regiuni mărite și parțial separate de rest a tubului digestiv (la marsupiale, maimuțe și ierbivore).

*Tabelul nr. 57*

**Tipurile de interacţiuni între microbiota normală a sistemului digestiv şi gazda animală**

(după Hungate, 1978)

| Modelul | Exemple | Alimentele caracteristice | Microbiota | Tipul de gaze produse | Digestia microorganismelor | Oxidarea acizilor organici ca sursă de energie pentru gazdă | Coprofagie |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Competiţie | Carnivore *Pinnipedia* (focă, morsă) | În special, proteine animale, glucide, grăsimi. | Bacterii în colon | $CH_4$ sau $H_2$ | Nu | Foarte redusă | Rară |
| | Insectivore (cîrtiţă) | Puţine fibre vegetale. | | | | | |
| | Omnivore (om) | În special, alimente animale şi vegetale<br>Puţine fibre | Bacterii în colon | $H_2$ sau $CH_4$ | Nu | Foarte redusă | Nu |
| Cooperare<br>Cameră de fermentaţie (rumen) în derivaţie laterală | Rumegătoare (*Ruminantia*) *Bovidae*, *Ovinae*, *Tylopoda*, (cămilă, lamă, cerb, elan) *Hipopotamidae*, (hipopotam) | Vegetale, inclusiv fibre. | Bacterii şi protozoare. | $CH_4$, $CO_2$, $H_2$ | Da | Da | Nu |
| Cameră de fermentaţie „în linie" | Marsupiale ierbivore | Ţesuturi vegetale, inclusiv fibre. | Bacterii şi protozoare | $CH_4$ sau $H_2$ | Da | Da | Nu |
| | Maimuţe vegetariene | Mai puţine fibre | Bacterii | $CH_4$ sau $H_2$ | Da | Da | Nu |
| Competiţie + cooperare (tipul cecal) | *Perissodactyla* (cal, zebră)<br>*Proboscidea* (elefant) | Ţesuturi vegetale cu concentrate vegetale şi fibre. | Bacterii şi protozoare | $CH_4$ | Nu | Da | Nu |
| *Rodentia* (şoarece etc.) | | Ţesuturi vegetale cu concentrate vegetale şi fibre. | Bacterii şi puţine protozoare | $H_2$ sau $CH_4$ | Da | Da | Da |
| *Lagomorpha* (iepure) | | | | | | | |

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Caracteristica fundamentală este reprezentată de dezvoltarea unei microbiote imense, strict anaerobe, care fermentează hrana cu producere de acizi graşi volatili absorbiţi şi oxidaţi de gazdă, biomasă microbiană şi gaze ($CO_2$, $CH_4$ sau $H_2$).

Interacţiunea nutriţională majoră între microorganisme şi gazdă este de *cooperare*.

3) „Tipul cecal" — întîlnit la cal, rozătoare, iepure, elefant etc. — corespunde animalelor cu stomac acid (în care majoritatea bacteriilor sînt omorîte) şi un cecum bine dezvoltat. Materialele nedigerabile de către gazdă sînt fermentate într-un cecum lărgit şi în regiunea superioară a colonului. Celulele microbiene produse nu pot fi digerate de către gazdă, deoarece se formează distal faţă de regiunea în care se găsesc enzimele gazdei ce ar putea asigura utilizarea lor. „Tipul cecal" este mai puţin eficient decît cel ruminal (tabelul nr. 57).

Handicapul este compensat, cel puţin la unele specii, prin coprofagie, care asigură ingestia de nutrienţi sub formă de corpuri microbiene şi de acizi organici rezultaţi din fermentaţie.

Interrelaţiile nutriţionale dintre microorganisme şi gazdă în cadrul „tipului cecal" sînt de *cooperare şi competiţie* (Hungate, 1978).

## ROLUL FIZIOLOGIC AL MICROBIOTEI GASTROINTESTINALE

Microorganismele gastrointestinale au funcţii nutriţionale cu importanţă diferită la rumegătoare, pseudorumegătoare şi la mamiferele monogastrice.

Rolul lor în viaţa organismelor şi asupra diferitelor funcţii ale sistemului digestiv au fost studiate, în special, pe animale axenice („germ-free"), sau au fost deduse din observarea unor animale cu boli şi anomalii intestinale, care determină perturbări în structura şi funcţia microbiotei normale.

Aceste studii au demonstrat că, în timp ce la rumegătoare rolul microorganismelor indigene este esenţial, la animalele monogastrice şi în special la om (la care a fost în special studiat) este mai degrabă accesoriu.

**Fermentaţia în intestinul gros.** La animalele adulte, în funcţie de cantitatea de alimente ingerate şi de natura lor, cantităţi importante din materialele ce nu pot fi degradate de enzimele acestora în stomac şi intestin sînt reţinute temporar în intestinul gros. Ele includ constituenţi fibroşi provenind din materialele vegetale (celuloză, hemiceluloze), amidon, pectine, proteine şi acizi nucleici etc. Lor li se adaugă macromolecule endogene aparţinînd unor clase diferite de polizaharide ca, de exemplu, mucus gastrointestinal, imunoglobuline, constituenţi ai celulelor descuamate etc. precum şi unele glucide cu greutate moleculară mică, cum sînt stahioza din fasole, rafinoza din semînţele de bumbac etc.

În cazul bolnavilor cu deficienţă genetică de hidroliză a lactozei în intestinul subţire, aceasta devine disponibilă pentru fermentaţie în intestinul gros. Nu se ştie dacă în intestinul gros uman ajung şi cantităţi semnificative din constituenţii cărnii, care, probabil, sînt utilizaţi, în majoritate, de enzimele compartimentelor superioare (Wolin, 1981). Hidroliza substanţelor complexe şi transportul produşilor rezultaţi în celulele microbiene sînt efectuate de sisteme enzimatice inductibile. Cît timp în intestin se găsesc substanţe

fermentabile simple, adecvate utilizării lor de către microorganisme, acestea sînt preluate direct.

Sinteza enzimelor hidrolitice este blocată prin represie sau activitatea lor este inhibată prin feedback. Fermentația este asigurată de o comunitate complexă de bacterii, care atacă hexozele cu producere de acizi grași volatili (acetic, propionic, n-butiric, izobutiric, valeric, izovaleric și caproic), metan și $CO_2$.

Zijlstra și colab. (1977) au stabilit reacția globală a fermentației în formula:

$$34{,}5\ C_6H_{10}O_5 \rightarrow 48 \text{ acid acetic} + 11 \text{ acid propionic} + 5 \text{ acid butiric} +$$
$$+ 23{,}75\ CH_4 + 34{,}25\ CO_2 + 9{,}5\ H_2O.$$

În stabilirea ei au ținut seama de următoarele condiții: 1) Singurele produse ale fermentației sînt acizii grași volatili enumerați, $CH_4$ și $CO_2$; 2) toți acești produși sînt formați de la $C_6H_{12}O_6$ (glucoză) entitatea monomeră majoră a celulozei; 3) fermentația unui mol de hexoză produce 4 moli de ATP și fiecare mol de ATP furnizează energia necesară pentru sinteza a 10,5 g celule/greutate uscată; 4) acizii grași volatili sînt produși în aceleași proporții ca în materiile fecale.

Tabelul nr. 58 prezintă datele cantitative privind creșterea bacteriilor și produșii fermentației în intestinul gros uman.

*Tabelul nr. 58*

**Date cantitative privind numărul, biomasa bacteriilor și produșii fermentației în intestinul gros** (după Wolin, 1981)

| Substratul și produsele | Cantitatea per gram masă umedă | Cantitatea per 120 g (masă umedă) |
|---|---|---|
| Bacterii | $1 \times 10^{11}$ celule | $1{,}2 \times 13^{13}$ celule |
| Masă bacteriană uscată | 133 mg | 16 g |
| Hexoză necesară * | 3,08 mmoli | 369 mmoli |
| ATP necesar ** | 12,9 mmoli | 1 551 mmoli |
| Acetat format | 4,26 mmoli | 511 mmoli |
| Propionat format | 0,96 mmoli | 117 mmoli |
| Butirat format | 0,46 mmoli | 55 mmoli |
| Metan format | 2,10 mmoli | 252 mmoli |
| $CO_2$ format | 3,08 mmoli | 369 mmoli |

* De la un mol de hexoză se formează 4 moli de ATP.
** Un mol ATP este necesar pentru 10,5 g celule/greutate.

Din analiza datelor acestui tabel, rezultă că în cursul fermentației se produc mari cantități de acizi grași. Hoverstad, Bjornklett și Fausa (1983) apreciază concentrația lor ca variind între 28 și 188 mM/kg (cu o medie de 77 mM/kg).

Aceste concentrații sînt mai mari decît se elimină prin fecale, ceea ce sugerează că o parte din acizii grași formați sînt absorbiți prin peretele colonului, trec în sînge și sînt metabolizați de organismul gazdei (Savage, 1986). În felul acesta, acizii grași volatili produși în cursul fermentației intestinale pot deveni o sursă apreciabilă de energie, în special la organis-

BCU ȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mele a căror alimentație include mari cantități de fibre vegetale (Wolin, 1981).

Unele microorganisme intestinale sintetizează în exces față de nevoile proprii, o serie de vitamine pe care le eliberează în intestin (acid folic, piridoxină, biotină, acid pantotenic, riboflavină, vitaminele K și $B_{12}$). Nu se știe în ce măsură ele sînt preluate efectiv de om, deoarece sînt produse, în special, de microorganisme prezente în cecum și în colon și, uneori, de bacterii ce se dezvoltă pe suprafața epiteliului intestinului subțire.

În unele cazuri, efectul poate fi invers, respectiv de deficit în vitamina $B_{12}$ pentru om, în urma consumării ei de către microorganismele intestinale care au nevoie pentru metabolismul propriu. În plus, bacteriile se lizează și eliberează în sistemul digestiv al mamiferelor cantități importante de constituenți citoplasmatici, membrane, pereți celulari etc. Liza poate fi determinată de enzimele proprii (endogene) — lysis from within — („din interior") în cazul celulelor senescente, de acțiunea enzimelor provenite de la animale (enzime pancreatice) sau de muramidazele de tip lizozim, prezente în secrețiile multor celule epiteliale.

Întrucît constituenții cărnii sînt digerați de enzimele proprii organismelor gazdă, unul din produșii azotați important în intestinul gros este ureea. Produsă de gazdă, prin degradarea compușilor cu N, ureea ajunge în intestin din sînge.

Microorganismele o hidrolizează la $CO_2$ și $NH_3$, care este folosit de bacterii pentru biosinteze.

În cursul fermentației sînt produse cantități importante de gaze ($CO_2$, $H_2$, $CH_4$), apreciate de Mallison (1987) la 200—2 000 ml/zi (în medie 600 ml/zi). La aproximativ 33% din populație produsul major este metanul. O mare parte din $H_2$ și $CH_4$ produs în intestinul gros sînt absorbite în sînge, de unde trec în pulmon pentru a fi expirate, iar restul este eliminat. Producția simultană de $CH_4$ și $H_2$ este rară, întrucît $H_2$ este folosit pentru reducerea $CO_2$ la metan. Există și cazuri de supraproducție de $H_2$, creatoare de disconfort, asociată cu fermentația rapidă a unor glucide cu greutate moleculară mică (cum este stahioza), inaccesibile altor modalități de degradare (Wolin, 1981).

Microbiota normală influențează durata tranzitului alimentelor pe cale de digerare în intestin, care este mai scurtă la animalele convenționale decît la cele germ-free. Mecanismul acestei acțiuni este necunoscut. El ar putea fi reprezentat de acțiunea sinergică a unor constituenți chimici sau fizici din alimentație și a produșilor finali de metabolism ai microorganismelor asupra proceselor de neurotransmitere la mușchii netezi.

În general, microbiota din intestinul gros se comportă *in situ*, ca un sistem ecologic bine echilibrat, față de modificările periodice induse de variațiile alimentației. Atît timp cît acest echilibru este menținut, sinergia dintre microbiota și țesuturile animalului asigură nutriția normală și sănătatea gazdei.

Sistemul ecologic microbiota/intestin poate fi uneori perturbat prin: a) administrarea de substanțe antibiotice, care distrug microorganismele sensibile creînd disbioze; b) prin infecții sau alte boli ale sistemului. În aceste cazuri, mecanismele de reglare sînt perturbate, compoziția normală a microbiotei și activitățile ei sînt alterate, iar consecințele pentru gazdă sînt negative.

### Influențe asupra enterocitelor

Microbiota normală influențează viteza de turnover a enterocitelor (celulele epiteliale digestive/absorbtive din intestinul subțire) și a activității lor enzimatice. În general, viteza de înlocuire a acestor celule este de două ori mai mare la animalele convenționale de laborator decît la cele axenice. Influența asupra activităților enzimatice ale enterocitelor a fost studiată, în special, la rozătoare ,,germ-free'' la care numărul enterocitelor prezente pe suprafața mucoasei intestinului subțire este mai mare decît la animalele convenționale. La aceste animale, microbiota intervine pentru a menține activitățile enzimatice la nivele inferioare, în special prin menținerea populației de enterocite la densități mai mici decît cele de la ,,germ-free''.

Mecanismul și semnificația acestor activități sînt necunoscute (Savage, 1986).

— Microbiota intestinală influențează concentrația, clasa chimică și funcția steroizilor biliari, colesterolului, acizilor biliari și chiar ale anumitor hormoni. Enzimele produse de bacteriile indigene pot realiza deconjugarea, desulfurarea și transformarea unor compuși chimici prin mecanisme necunoscute, dar cu consecințe nutriționale importante pentru animalele-gazdă.

— Influențează absorbția apei și a electroliților în cecum și indirect absorbția produșilor de metabolism bacterieni ce pot fi utilizați ca sursă de C și energie de către țesuturile gazdei. Argenzio și colab. (1977) au demonstrat că absorbția acestor molecule în sînge se realizează prin procese cuplate cu absorbția electroliților.

### Modificarea anatomică a sistemului digestiv

Studiul anatomiei sistemului digestiv la animalele ,,germ-free'' a evidențiat deosebiri majore față de cele convenționale. Ele includ:

1) existența unui perete intestinal mai subțire și mai fragil, datorită diminuării tunicii musculare;

2) reducerea numărului celulelor specializate în producerea de mucus, care este prezent pînă în intestinul gros (în mod normal, mucusul este degradat de microorganisme în intestinul gros);

3) cecumul este mărit de peste șase ori față de normal, reprezentînd principala cauză a mortalității animalelor axenice;

4) celulele epiteliale ale vilozităților mucoasei intestinale se reînnoiesc de două ori mai puțin rapid la animalele axenice decît la cele normale;

5) tranzitul intestinal este încetinit și metabolismul apei modificat.

Cum multe din aceste modificări sînt localizate în intestinul subțire, unde proliferarea bacteriană este redusă. Raibaud și Ducluzeau (1984) consideră că microbiota normală exercită un efect la distanță, consecință a faptului că substanțele produse în intestinul gros sînt absorbite și vehiculate prin sistemul sanguin.

### Rolul protector al microbiotei normale

### Funcția de barieră antiinfecțioasă

Numeroase observații experimentale și epidemiologice au evidențiat faptul că microorganismele autohtone, adaptate să se dezvolte în anumite habitate naturale, exercită o funcție de barieră, care protejează organismele

animale de implantarea unor microorganisme alohtone ce pătrund în mod normal de la exterior cu alimentele, apa sau aerul.

Această funcție este pregnant evidențiată de comportamentul diferit al organismelor axenice („germ-free") față de cel al animalelor convenționale (Raibaud și Ducluzeau, 1984). Șoarecii axenici pot fi infectați per os cu mare ușurință cu *Shigella flexneri* sau cu *Salmonella enteritidis* (10 celule bacteriene). Acestea se localizează în intestin, se multiplică pînă cînd populația lor atinge o densitate maximă (1—10 miliarde/g conținut intestinal) în 12—24 de ore, după care se stabilizează numeric, menținîndu-se practic la acest nivel (fig. 279).

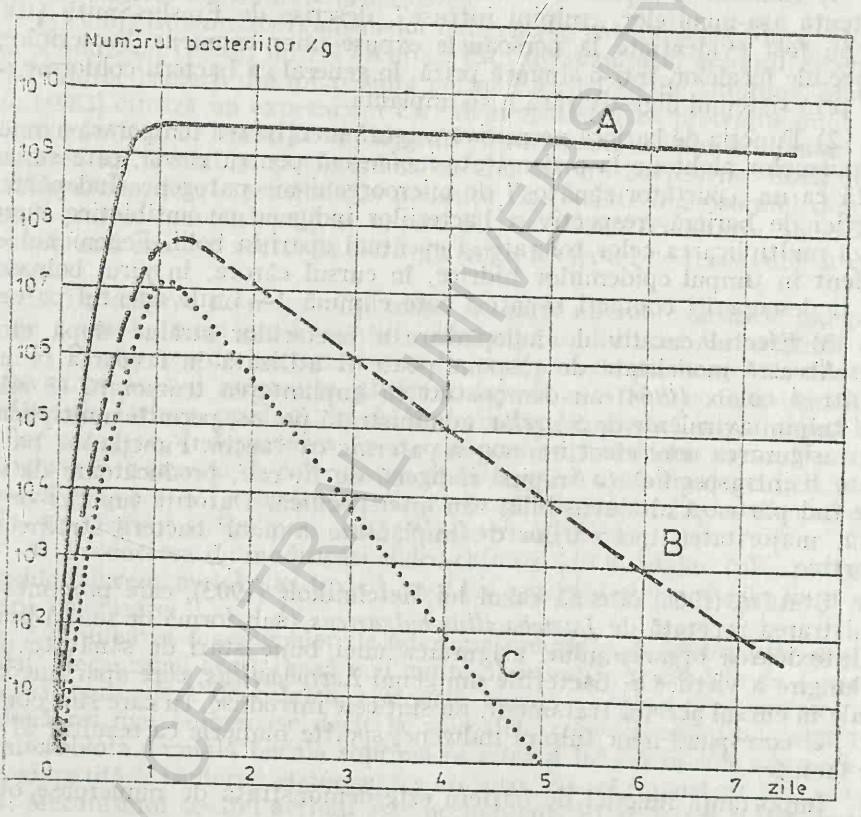



Fig. 279. — Bacteria *Shigella flexneri* administrată *per os* la șoareci axenici se multiplică rapid și se menține apoi indefinit (A). La animalele convenționale (holoxenice) sînt complet eliminate în cîteva zile (B), ca și particulele inerte utilizate ca marker de tranzit (în acest caz, spori de *Bacillus subtilis* strict termofil, incapabili de germinare) (după Ducluzeau și Raibaud, 1976).

În aceleași condiții, animalele holoxenice (convenționale), purtătoare a unei microbiote normale, complexe și necontrolabile, elimină microorganismele infectante cu aceeași viteză cu care îndepărtează un marker de control inert cum sînt sporii de *Bacillus subtilis* termofili, incapabili să germineze. Doza infectantă, în acest caz, este de $10^6$ celule de *S. enteritidis*. Fenomenul a fost descris sub denumirea de „efect de barieră" (Ducluzeau, 1970).

Van der Waaij (1971, 1989) a descris un caz particular al aceluiași fenomen sub denumirea de „rezistență la colonizare". El îl definește drept mecanismul exercitat de bacteriile intestinale indigene, care controlează colonizarea intestinală de către microorganisme patogene sau potențial patogene și îl consideră cu importanță vitală pentru organismele compromise din punct de vedere imunologic. Lloyd și colab. l-au descris sub denumirea de „excludere competitivă".

Au fost descrise trei tipuri de „rezistență la colonizare", în raport cu intensitatea „efectului de barieră" (Raibaud și Ducluzeau, 1984):

1) Eliminarea rapidă a bacteriilor exogene. Situația este ilustrată de existența așa-numitelor „tulpini intruse", descrise de Emslie-Smith (1964). Ele au fost evidențiate la persoanele expuse unor examene bacteriologice zilnice ale fecalelor, într-o singură priză, în general ca bacterii coliforme care trec prin sistemul digestiv fără a se implanta.

2) Funcția de barieră permisivă asigură menținerea temporară a microorganismelor alohtone la o densitate inofensivă pentru gazdă, care se comportă ca un „purtător sănătos" de microorganisme patogene. Îndepărtarea funcției de barieră, respectiv a bacteriilor indigene cu antibiotice, favorizează multiplicarea celor tolerate și eventual apariția bolii. Fenomenul este evident în timpul epidemiilor hidrice, în cursul cărora, în jurul bolnavilor pot fi descoperiți contacți sănătoși care elimină 1—3 zile agentul patogen.

3) Efectul curativ de îndepărtare a bacteriilor străine după cîteva zile. Această modalitate de răspuns poate fi utilizată în favoarea omului. Istrati și colab. (1964) au demonstrat că implantarea temporară (3 zile) a unei tulpini avirulente de *Shigella*, administrată per os, permite multiplicarea ei și asigurarea unui efect imunogen puternic ca vaccin. Funcția de barieră poate fi intraspecifică (o tulpină indigenă de *E. coli*, producătoare de colicine îndepărtează alta sensibilă) sau interspecifică. Datorită funcției de barieră, majoritatea încercărilor de implantare a unor bacterii străine sînt abortive.

Sturdza (1966) citează cazul lui Metchnikoff (1903), care propunea administrarea repetată de *Lactobacillus bulgaricus* (sub formă de iaurt) pentru dezintoxicarea organismului, asigurarea unei bune stări de sănătate și de prelungire a vieții. Or, bacteriile din genul *Lactobacillus*, care apar uneori în fecale în cursul acestui tratament, nu sînt cele introduse, cu care sînt confundate, ci corespund unor tulpini indigene, sporite numeric ca rezultat al hranei lactate.

Importanța funcției de barieră este demonstrată de numeroase observații la om:

1) Microbiota intestinală inhibă creșterea unor patogeni importanți *(Vibrio cholerae, Salmonella* sp., *Shigella dysenteriae* etc.). Suprimarea ei cu antibiotice diminuă marcant rezistența față de aceștia.

2) Microorganismele rezidente în regiunea endocervicală uterină *(Lactobacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Neisseria* sp. saprofite, *Candida albicans)* inhibă activitatea și implantarea gonococului *(Neisseria gonorrhoeae)*.

3) Îndepărtarea cu antibiotice a microbiotei bucofaringiene este urmată de instalarea promptă a unor bacterii patogene *(Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Neisseria meningitidis* etc.).

## Mecanismele rezistenței la colonizare

Implicarea directă a microbiotei intestinale este demonstrată de posibilitatea asigurării unor implantări reușite după tratamentul cu antibiotice cu spectru larg, care îndepărtează bacteriile cu funcție de barieră. În aceste cazuri, organismele tratate pot fi infectate cu cîteva celule bacteriene, spre deosebire de martori, care necesită doze de ordinul a milioane de bacterii.

Fenomene similare de depresiune cantitativă sau calitativă a microbiotei normale se pot observa și în mod „spontan".

Mecanismele efectului de barieră nu sînt cunoscute. Pe baza cazurilor observate au fost incriminate următoarele:

1) Competiția microorganismelor indigene cu patogenii are, după Ducluzeau și Raibaud (1976), un rol esențial. Ea este rezultatul acțiunii sinergice a mai multor bacterii din microbiota normală cu bacteriile alohtone. Mackowiak (1982) citează un experiment care demonstrează că protecția unui șoarece axenic față de infecția cu *Shigella flexneri* este asigurată numai prin infectarea lui prealabilă și simultană cu trei tulpini bacteriene: două specii de *Clostridium*, foarte sensibile la prezența $O_2$ (izolate din sistemul digestiv al unui șoarece convențional), și tulpina $K_{12}$ de *E. coli* (facultativ anaerobă). Separat, nici una din aceste bacterii nu asigură efectul de rezistență la colonizare.

2) Producerea de metaboliți toxici de către microorganismele indigene, ca, de exemplu, acizi grași volatili, substanțe inhibitoare ale creșterii etc.

3) Producerea de bacteriocine sau alte tipuri de substanțe antibiotice. În favoarea acestui mecanism pledează faptul că streptococii α-hemolitici *viridans* din faringe, producători de bacteriocine, împiedică implantarea bacteriilor patogene. Îndepărtarea lor cu ajutorul antibioticelor creează un vid ecologic și este urmată de colonizarea orofaringeană a unor patogeni ca *Streptococcus pyogenes, S. pneumoniae, Neisseria meningitidis, Legionella pneumophila* etc. (Sprunt și Redman, 1968; Mackowiak, 1982).

4) Producerea de modificări fizico-chimice ale mediului (pH, potențial de oxidoreducere, metaboliți toxici), care fac anumite nișe ecologice improprii pentru colonizare.

5) Inhibarea fenomenelor de adeziune esențiale ca precondiție a colonizării. Mecanismul are la bază mai multe observații: a) celulele de *Candida albicans*, care aderă de celulele epiteliale bucale ale șoarecelui axenic, sînt de două ori mai numeroase decît la animalele convenționale; b) bacteriile din microbiota normală bucală suprimă *in vitro* și inhibă *in vivo* aderarea de hidroxiapatită a bacteriei *Actinomyces viscosus*, cu rol important în cariogeneză. Mecanismul acestei acțiuni este necunoscut. El ar putea fi determinat de *Streptococcus mutans* bacteriocinogen sau de faptul că situsul de legare al *A. viscosus* s-ar suprapune parțial peste cel al unor bacterii indigene („competiție pentru situsul de aderență") (Kuramitsu și Paul, 1980).

6) Degradarea toxinelor bacteriei agresoare de către microorganismele autohtone. Mecanismul explică diferențele dintre toxicitatea mai mare a unor toxine administrate *per os*, comparativ cu calea parenterală. El explică, de asemenea, rezistența mai mare la toxina botulinică administrată *per os* a animalelor convenționale comparativ cu cele „germ-free".

7) Competiția pentru nutrienți, incriminată de unii cercetători, ar putea acționa semnificativ la nivelul stomacului și al intestinului subțire, care conțin comunități microbiene asociate cu suprafețele epiteliale. Straturile

de microorganisme aderente ar putea prelua o parte din nutrienții gazdei cu care ar putea competiționa, lipsindu-le de o parte din hrana ingerată. Procesul nu pare să fie deosebit de important, deoarece celulele animale sînt în circumstanțe normale avantajate față de bacterii datorită biomasei lor care depășește cu mult pe cea a microorganismelor. Ceva mai mult, celulele animale pot obține o parte din nutrienți din compușii macromoleculari și din produșii metabolismului energetic ai microbiotei indigene. În cazul organismului uman, aceasta ar corespunde la ~ 10% din nevoile sale energetice (Savage, 1977, 1986).

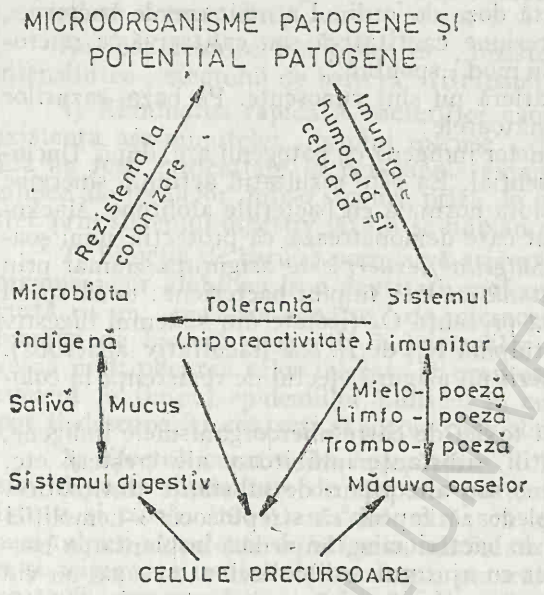



Fig. 280. — Reprezentarea schematică a interacțiunilor dintre organismele-gazdă și microbiota normală, implicate în rezistența la colonizare a sistemului digestiv. Acționînd sinergic, sistemul imunitar asociat cu intestinul și microbiota normală împiedică implantarea microorganismelor patogene sau potențial patogene (după van der Waaij, 1989).

În colon și în cecum, competiția comunităților de microorganisme cu țesuturile gazdei pentru substanțele provenite din alimente sînt reduse sau nule.

Microorganismele se dezvoltă în special prin hidroliza și fermentația substanțelor din dietă, care nu au fost digerate de enzimele produse de celulele animale.

**Rolul mecanismelor imunitare.** Studiile efectuate pe organisme „germfree" au demonstrat că microorganismele indigene stimulează mecanismele imunitare. Figura 280, după van Waaij (1989), sintetizează influențele microbiotei normale asupra sistemului imunitar implicate în apariția rezistenței la colonizare a sistemului digestiv. În lipsa lor totală, animalele au fagocite hiporeactive (polimorfonucleare și macrofage), leucopenie, țesut limfoid subdezvoltat, nivel scăzut de anticorpi și interferon etc. Aceste date demonstrează că dezvoltarea unei microbiote normale în sistemul digestiv are o mare importanță pentru starea generală a gazdei animale.

Cu o microbiotă bine compusă, organismul-gazdă este protejat față de infecțiile cu un număr moderat de patogeni enterici *per os*. Ea asigură existența unui grup important de specii permanente, care păstrează între ele proporții constante și a căror stabilitate se manifestă în condiții normale, printre altele, prin dificultatea implantării tulpinilor noi (Sturdza, 1963)

Populațiile de microorganisme din sistemul digestiv și gazda lor formează un sistem ecologic al cărui echilibru este indispensabil pentru sănătatea individului. În acest sistem se realizează o serie de interacțiuni complexe, sinergice și antagonice între diferitele populații de microorganisme, pe de o

parte, ca și între ele și gazda lor, pe de alta. Pentru ca ecosistemul să se perpetueze este necesară funcționarea, fără greșeală, a ansamblului interacțiunilor, fără nici un dezechilibru, în favoarea unuia din componenți. Acest echilibru este alterat, spre exemplu, în stările de *disbioză* (numite limitativ și nerecomandabil de *disbacterioze)*, care apar la om, adesea, în urma terapiei fără precauții cu antibiotice cu spectru larg de acțiune, în urma căreia se pot observa modificări în compoziția și activitatea microbiotei normale, cu grade diferite de gravitate.

După Ducluzeau și Raibaud (1984), din punct de vedere ecologic, declanșarea unei infecții bacteriene intestinale este consecința a două fenomene, realizate simultan: 1) pătrunderea unui agent patogen în intestin și 2) depresia sau supresia efectului de barieră și a funcției sale de a se opune implantării și multiplicării patogenilor respectivi. Cunoașterea bacteriilor cu rol de barieră și a substanțelor pe care le produc ar putea permite eliminarea sau măcar inhibarea unor efecte nedorite. Ea ar deschide calea posibilității de implantare artificială a unei microbiote adecvate la nou-născut în vederea asigurării unei protecții riguroase.

### Rolul negativ al microbiotei normale

Unele observații de laborator demonstrează existența unor efecte negative ale microbiotei normale. Ele nu invalidează numeroasele funcții benefice, ci ilustrează, mai degrabă, complexitatea interacțiunilor dintre microorganisme și animalele-gazdă.

Unele microorganisme indigene pot ajuta un alt microorganism patogen să pătrundă în organismul-gazdă și/sau să evite efectele terapeutice. *Entamoeba histolytica* trăiește normal în mod comensal în intestinul gros, hrănindu-se cu bacterii și cu celule epiteliale desprinse de pe mucoasă. Stabilirea ei în organismele-gazdă depinde de microbiota rezidentă. Ca probă, animalele axenice („germ-free") sînt foarte rezistente la infecție. La animalele convenționale este rar invazivă, atacînd peretele colonului și declanșînd apariția de leziuni grave în ficat și alte organe. Episoadele rare de patogenitate sînt determinate, după Mackowiak (1982), de intervenția factorilor de virulență proveniți de la bacteriile intestinale indigene.

Un alt exemplu este furnizat de infecția cu virusul choriomeningitei limfocitare la șoarece. Leziunile grave nervoase nu sînt consecința efectului citopatogen viral, ci al răspunsului imun normal, caracteristic animalelor convenționale. Animalele „germ-free" prezintă o rezistență mărită față de virus, deoarece în lipsa microbiotei normale răspunsul lor imun celular este mai slab. Ca urmare, mortalitatea lor este mai mică de jumătate față de cea a animalelor-martor.

Nu se știe în ce măsură aceste exemple au echivalențe și la om, la care însă este cert că unele bacterii indigene se pot comporta ca „oportuniste", determinînd complicații la persoanele imunosupresate, sau ca „invadatori secundari" după unele infecții grave. Microbiota rezidentă a fost implicată în sindromul grefă-contra-gazdă după transplantul măduvei oaselor, ca și în cel consecutiv timectomiei neonatale. Ca probă, îndepărtarea microbiotei normale cu antibiotice sau menținerea stării „germ-free" reduce incidența acestor complicații.

**Relația dintre microbiota normală și cancer** a devenit evidentă după ce s-a demonstrat că microorganismele pot hidroliza substanțe inofensive

cu producere de produși cancerigeni. Walker (1973) a semnalat posibilitatea producerii de nitrozamine ca rezultat al reducerii nitratului și aminelor secundare (utilizate ca prezervanți) de către microorganisme. Mackowiak (1982) consideră acest risc ca minor la om, deoarece nitrații sînt absorbiți rapid înainte de a ajunge în contact cu microbiota bogată intestinală. Ceva mai mult, unele microorganisme intestinale pot sintetiza la pH neutru nitrozamine *in vivo* (Hawksworth și Hill, 1971).

În sfîrșit, Mackowiak (1982) citează cazul cicazinei (glicozil extras din Cycas), inofensivă pentru animalele „germ-free", care administrată *per os* la animale convenționale și la om este convertită la metilazoximetanol (oncogen) de către bacteriile intestinale.

### Relația ecologică dintre microbiota normală și translocația bacteriilor din intestin

Translocația este fenomenul de trecere a bacteriilor din lumenul intestinal în ganglionii mezenterici, urmat adesea de localizare în diferite situsuri extraintestinale. El are loc cu precădere la persoane imunosupresate, expuse unor mari traumatisme sau intervenții chirurgicale, și determină complicații infecțioase grave, adesea sistemice, care pericliteză existența bolnavilor spitalizați.

Translocația se realizează, în mod obișnuit, practic, în exclusivitate cu bacterii aerobe și facultativ aerobe. A fost descrisă pînă în prezent pentru speciile: *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Enterococcus* sp., *Streptococcus, Lactobacillus* sp., *Candida albicans* și, probabil, *Staphylococcus* sp. (Wells, 1988, 1990). Translocația se poate produce cu ușurință și cu bacterii ca: *Salmonella* sp. și *Listeria monocytogenes*, care supraviețuiesc sau chiar se multiplică în macrofage, putînd să le transporte în situsuri extraintestinale.

Prin contrast, în mod normal, bacteriile strict anaerobe nu sînt expuse translocației din intestin și, în consecință, produc numai rar complicații infecțioase. Ele pot fi translocate — în asociație cu bacteriile strict și facultativ aerobe — numai în cazul organismelor la care integritatea mucoasei intestinale este grav compromisă, leziunile distrugînd, probabil, mecanismele care controlează translocația selectivă a bacteriilor strict și facultativ aerobe. În aceste cazuri (după iradiere letală, arsuri grave, ischemie mezenterică acută, administrare orală de acid ricinoleic etc.), cu cît leziunile sînt mai severe cu atît translocația bacteriilor anaerobe se face mai ușor și mai masiv.

**Calea de translocare.** Studiile experimentale efectuate pe animale gnotobiotice sau convenționale traumatizate au demonstrat că bacteriile strict și facultativ aerobe sînt translocate prin epiteliul intestinal histologic intact. Celulele epiteliului intestinal — în mod particular cele ileale — ar reprezenta poarta de intrare principală, iar ganglionii mezenterici limfatici ar fi structurile cele mai sensibile.

Wells (1990) propune următoarea secvență de desfășurare a translocației: bacteriile strict și facultativ aerobe sînt preluate de celulele epiteliale

digestive/absorbtive (enterocite), care ar acționa ca fagocite fixe și sînt trecute în lamina proprie intestinală. De aici, ele pot lua calea canalelor limfatice, care drenează ganglionii limfatici mezenterici, sau pot ajunge direct în ficat și apoi în alte organe, pe cale vasculară. Fenomenul este favorizat de intervenția macrofagelor tisulare. Au mai fost semnalate cazuri de migrare retrogradă în pulmon și de migrare transmurală în diferite organe, în special în cazurile de dezvoltare excesivă a bacteriilor translocabile în intestinul superior (van Uffelen și colab., 1987).

Bacteriile strict anaerobe nu pot transloca deoarece se leagă greu de enterocite, neavînd situsuri-receptor pentru celulele epiteliale intestinale. Ele trec numai prin epiteliul lezat. După Moore și Holdeman (1975), raportul dintre bacteriile anaerobe și cele strict sau facultativ aerobe în intestin oscilează între 100:1 și 1000:1. Acesta demonstrează că translocația nu este dependentă de densitate.

**Mecanismul translocației intestinale** nu este cunoscut. După van der Waaij (1972, 1989), rolul fundamental al bacteriilor strict anaerobe în ecologia intestinului ar fi de a limita multiplicarea excesivă și de a împiedica translocația bacteriilor aerobe potențial patogene și colonizarea unor situsuri extraintestinale. Mecanismul a fost descris sub denumirea de *rezistența la colonizare.*

În acord cu acest concept, translocația este determinată de diminuarea capacității bacteriilor strict anaerobe de a-și exercita această funcție de control. Cunoașterea exactă a mecanismului rezistenței la colonizare va permite limitarea fenomenului de translocație și reducerea incidenței complicațiilor infecțioase și mortalității determinate de ele (Wells, 1990).

## MICROBIOTA ALTOR SUPRAFEȚE ALE ORGANISMULUI UMAN SĂNĂTOS

Mai puțin studiate, diferitele regiuni ale corpului (piele, conjunctivă, nazofaringe, bucofaringe, căile genitourinare inferioare) sînt populate de o microbiotă caracteristică, uneori asociată cu bacterii potențial patogene (Rosebury, 1962; Mackowiak, 1982). Cele mai cunoscute sînt următoarele:

Piele — *Staphylococcus* (inclusiv *S. aureus), Corynebacterium* sp. (în special *C. acne), Propionibacterium, Candida* sp., *Malassezia furfur,* fungi dermatofiți.

Nazofaringe — *Staphylococcus* (inclusiv *S. aureus), Streptococcus* sp. (inclusiv *S. pneumoniae), Brancatarrhalis, Neisseria* sp., *Haemophilus* sp.

Conjunctivă — *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Haemophilus* sp.

*Orofaringe* — *Streptococcus* sp. *(S. pyogenes, S. pneumoniae,* streptococi hemolitici-*viridans), Branhamella catarrhalis, Neisseria* sp., *Lactobacilius* sp., *Corynebacterium* sp., *Haemophilus* sp., bacterii strict anaerobe, *Candida albicans,* diferite protozoare.

*Căile genitourinare inferioare* — *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* (vagin), *Corynebacterium* sp., *Neisseria* sp., bacterii anaerobe, bacili Gram-negativi neidentificați, *Candida albicans, Trichomonas vaginalis.*

# MICROBIOTA DIN RUMEN

**„Rumegătoarele pot fi descrise ca animale care se hrănesc cu microorganisme pe care și le cultivă în condiții foarte productive, înainte de a le prelua și utiliza odată cu produșii rezultați din fermentația glucidelor"**

R. E. HUNGATE

Substanțele vegetale formează o parte importantă din alimentele unei mari varietăți de mamifere. Lipsite de enzimele necesare pentru a le utiliza, acestea folosesc microorganismele prezente în sistemul digestiv pentru a asigura transformarea substanțelor polizaharidice complexe (celuloze, hemiceluloze, pectine, amidon etc.) la forme solubile și asimilabile. Contribuția microorganismelor la nutriția gazdei este diferită în funcție de localizarea compartimentului în care își desfășoară activitatea.

La *erbivorele nerumegătoare*, degradarea țesuturilor vegetale are loc, după digestia din stomac și intestinul subțire, într-un cecum lărgit și în colon. În unele cazuri, cecumul poate fi atît de mare încît poate atinge, uneori, lungimea corpului animalului. În acest caz, el este torsionat în spirală, în jurul propriului ax (Mișcalencu și Mailat-Mișcalencu, 1979). Procesul este relativ ineficient, gradul de digerare a celulozei și hemicelulozei fiind de ordinul a 20—30%. Produșii de metabolism ai microorganismelor, acizii organici, sînt absorbiți prin mucoasa intestinală în sînge și oxidați de celulele animale, în timp ce celulele microorganismelor sînt, în cea mai mare parte, eliminate prin fecale.

*Rumegătoarele* (bovine, ovine, caprine etc.) reprezintă un caz particular datorită prezenței unui organ specializat pregastric — *rumenul* — la nivelul căruia are loc digestia celulozei și a altor polizaharide vegetale insolubile, prin activitatea unor microorganisme — bacterii și protozoare — adecvate acestui scop. La aceste animale „stomacul" este pluricompartimentat, fiind alcătuit din *rumen* (burduf), *reticulum* (ciur) și *omassum* (foios) (fig. 281), considerate ca expansiuni ale esofagului, deși dimensiunile lor sînt deosebit de mari comparativ cu acesta (Mișcalencu și Mailat-Mișcalencu, 1979).

Rumenul vacilor mature (500 kg) are o capacitate de 100 l și conține 30—50 l de lichid supus fermentației. Cel al ovinelor mature ( ~ 35 kg) are aproximativ 5—6 l. Celor trei compartimente enumerate li se adaugă stomacul propriu-zis sau *abomassum* (închegătorul), singurul compartiment care conține glande gastrice și la nivelul căruia începe digestia adevărată. El se continuă cu duodenul și respectiv intestinul subțire și gros.

## Microbiota din rumen

Rumenul este populat de o comunitate complexă de microorganisme indigene formată din bacterii specifice anaerobe, protozoare ciliate, un număr mic de protozoare flagelate, cîțiva fungi anaerobi. Se adaugă o serie de microorganisme facultativ anaerobe sau chiar aerobe, aflate în tranzit, nesemnificative atît cantitativ, cît și pentru contribuția lor la activitatea globală din rumen.

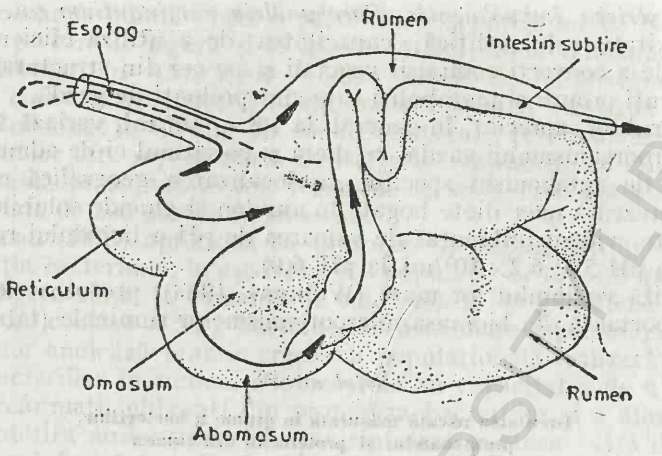



Fig. 281. — Reprezentarea schematică a structurii stomacului compus la rumegătoare.

### Bacteriile din rumen

Pot fi libere, imobile, mobile sau aderente de celulele mucoasei ruminale prin intermediul fimbriilor, glicocalixului sau polizaharidelor extracelulare. Cele mai multe ( ~ 70—80%) colonizează fracțiunea din conținutul rumenului reprezentată de particulele alimentare.

Se apreciază că din cele cîteva sute de specii bacteriene prezente în rumen numai 17—30, care domină numeric și funcțional, ar avea o activitate biochimică semnificativă, fapt sugerat și de prezența lor constantă la diferite specii de rumegătoare, în diferite regiuni geografice. Cel mai mult studiate sînt următoarele: *Bacteroides amylogenes, B. amylophilus, B. ruminicola, B. succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens, Clostridium lochheadii, Lachnospira fibrisolvens, L. multiparus, Methanobacterium ruminantium, Peptostreptococcus elsdernii, Ruminococcus albus, Selenomonas ruminantium, Succinogenes amylolytica, Veillonella gazogenes* etc. (Wolin, 1981; Williams, 1986).

### Protozoarele din rumen

Microbiota ruminală conține, în afară de bacterii, un grup înalt specializat de protozoare ciliate, căruia i se adaugă un număr redus de protozoare flagelate *(Monocercomonas* sp., *Thrichtromonas* sp.) al căror rol nu este încă stabilit.

Ciliatele aparțin la două grupuri distincte:

*Protozoarele oligotriche* (entodiniomorfide) sînt reprezentate de specii de: *Diplodinium, Entodinium, Metadinium, Ophryoscolex* etc. Ele înglobează și fermentează materiale particulate.

*Protozoarele holotriche*, cel mai mult studiate, aparțin ordinelor *Trichostomatina* și *Prostomatida*.

Speciile cele mai frecvent întîlnite sînt: *Isotricha intestinalis, I. prostoma, Dasytricha ruminantium*, cărora li se adaugă, în general, un număr mai mic de *Buetschlia parva, Charonina ventriculi* (sin. *Blepharocorys bovis)*,

*C.equi, Dasytricha kukuokaensis, Parabundleia ruminantium* ș.a. Ele au, pe lîngă activitate celulozolitică, capacitatea de a utiliza eficient glucidele solubile și de a converti compușii vegetali și pe cei din structura bacteriilor în constituenți proprii și metaboliți care sînt preluați de gazdă.

Numărul lor, apreciat, în general, la $10^5 - 10^6$/ml, variază în raport cu natura macroorganismului-gazdă, cu dieta și cu ritmul ei de administrare, cu fenomenele de antagonism specific, cu localizarea geografică etc. El este maxim în prezența unei diete bogate în amidon și glucide solubile ușor digerabile și este evident influențat de valoarea de pH a lichidului ruminal ($3 \times \times 10^5$/ml la pH 5,3; $6{,}2 \times 10^5$/ml la pH 6,0).

Datorită volumului lor mare (Williams, 1984), protozoarele reprezintă o parte importantă din biomasa microorganismelor ruminale (tabelul nr. 59).

*Tabelul nr. 59*

**Greutatea uscată măsurată în grame a bacteriilor, protozoarelor și proteinelor din rumen**

(după Wolin, 1981)

| Microorganismul | Grupul de rumegătoare: | |
|---|---|---|
| | Bovine | Ovine |
| *BACTERII* | | |
| Celule | 399 | 28.5 |
| Proteine celulare | 217 | 15,5 |
| *PROTOZOARE* | | |
| Celule | 315 | 22.5 |
| Proteine celulare | 172 | 12,3 |

Warner (1962) propune următoarele valori pentru bacterii și protozoare: eubacterii 1 $\mu m^3$, *Selenomonas* 30 $\mu m^3$, *Oscillospira* 250 $\mu m^3$, *Polymastigotes* 500 $\mu m^3$, *Entodinium* 10 000 $\mu m^3$, *Dasytricha* și *Diplodinium* 100 000 $\mu m^3$, *Isotricha, Metadinium, Epidinium* 1 000 000 $\mu m^3$. Cu toate acestea, cele mai multe date demonstrează, după cum era de așteptat, prevalența activității bacteriilor.

*Activitatea protozoarelor* în rumen este relativ puțin cunoscută datorită complexității ecosistemului și dificultății de a le separa de bacteriile vii, legate de suprafața lor sau prezente în vacuolele digestive (Nouzarede, 1978). Este demonstrat că protozoarele ciliate transformă o serie de constituenți vegetali și bacterieni în constituenți celulari proprii și în metaboliți care sînt utilizați de către gazdă.

Ca grup, importanța ecologică a protozoarelor derivă din capacitatea lor de a ataca celuloza, hemiceluloza, pectinele, amidonul, precum și de asimilare rapidă a glucidelor solubile.

Protozoarele ciliate utilizează glucoza, fructoza, galactoza, zaharoza, rafinoza și insulina, producînd acetat și butirat cînd fermentația este lentă și, respectiv, lactat cînd fermentația este rapidă. Procesul de utilizare eficientă a amidonului din hrană și a glucidelor solubile este benefic pentru gazdă deoarece inhibă și întîrzie fermentația bacteriană care ar duce la o acumulare de acid lactic și o scădere nocivă a pH.

Protozoarele ciliate obțin o parte din exigențele lor de N din celulele bacteriene pe care le ingeră și le digeră. Astfel, după Williams (1984), *Isotricha* înglobează *in vitro* 1 000 — 3 000 celule de *Escherichia coli*/oră. O parte din constituenții acestora sînt folosiți pentru creșterea proprie, iar restul este eliminat în mediu. În condiții naturale, principala sursă de hrană a protozoarelor este reprezentată de bacteriile capturate de cili, care continuă să crească pe suprafața lor. Numărul acestora este apreciat la 10—20 pe o suprafață de 200 $\mu m^2$ la *I. prostoma*.

Coleman (1975) apreciază că protozoarele ingeră într-un minut ~1% din populația bacteriană, în așa fel încît o populație de $10^5$—$10^6$ protozoare/ml ar putea digera zilnic în rumenul de oaie pînă la 45 g bacterii (lichidul ruminal de oaie conține ~50 g bacterii). Această mare capacitate de prădare a protozoarelor anulează practic creșterea populațională realizată prin multiplicarea bacteriilor în rumen. Protozoarele au capacitatea de a utiliza aminoacizii preformați, eliberați din proteoliza bacteriilor și a alimentelor, dar și de a sintetiza aminoacizi. Ele pot sintetiza și stoca ~1/3 din glucidele consumate sub formă de polizaharide de rezervă (homoglicani înalt ramificați, cu o lungime de 22 unități de glucoză, legate prin legături α,1-6 asemănătoare amilopectinei).

Spre deosebire de alți constituenți, majoritatea protozoarelor (75%) sînt reținute în rumen unde mor și sînt lizate. Williams (1984) apreciază că numai un număr echivalent cu 6—30% din greutatea lor uscată trece în intestinul subțire și că ~20% din proteinele microbiene disponibile pentru gazdă provin din protozoare. Ele sînt importante pentru aceasta deoarece au o valoare nutritivă similară celei a bacteriilor, dar au avantajul de a fi mai ușor digerabile.

Fermentarea polizaharidelor de rezervă intracelulară de către protozoarele rămase în rumen are efecte benefice pentru gazdă, deoarece extinde perioada de formare a acizilor grași volatili în fazele dintre două hrăniri și stabilizează evoluția procesului fermentativ.

În afară de rolul în nutriție, prin care contribuie la bunăstarea gazdei, protozoarele consumă $O_2$ și ajută la menținerea condițiilor de anaerobioză. Ele reglează numărul celulelor bacteriene cu care competiționează eficient.

## DEZVOLTAREA ECOSISTEMULUI RUMINAL

Instalarea comunității complexe de microorganisme ruminale implică o succesiune de evenimente, inițiată de o serie de bacterii-pionier, care modifică mediul prin crearea condițiilor de anaerobioză și formarea de acizi grași volatili.

Microorganismele din rumen provin — în grade diferite — din surse exogene (aer, apă, furaje, contact cu alte animale etc.). Infectarea are loc progresiv după naștere, ajungînd un maxim, la vițel, după aproximativ o lună. Capacitatea de a digera hrana uzuală este scăzută și coincide cu absența protozoarelor. În luna a doua, deși numărul bacteriilor nu crește semnificativ, capacitatea de digestie este mult îmbunătățită, odată cu apariția protozoarelor și cu modificarea proporției diferiților acizi organici (tabelul nr. 60).

După ~12 luni de la naștere, digestibilitatea ajunge la maximum, iar procesul de fermentație rămîne constant pentru toată viața animalului. În

*Tabelul nr. 40*

**Modificările funcțiilor rumenului la bovine, corelate cu succesiunile din evoluția microbiotei**
(după Lengemann și Allen, 1955)

| Virsta animalului | Nr. total de bacterii * ($10^9$ g) | Nr. de protozoare ($10^3$/ml) | Producerea de gaze de la celuloză (ml) | Conținutul mediu în acizi organici (m moli/l) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Succinic — lactic | Formic | Acetic | Propionic | Butiric | Total |
| O lună | 46 | 0 | 0,8 | 56 | 5,5 | 48,8 | 25,2 | 16,2 | 152 |
| Două luni | 28,5 | 137 | 4,2 | 6,6 | 1,5 | 69,7 | 32,4 | 18,6 | 129 |
| Trei luni | 38 | 659 | 3,8 | 6,1 | 1,5 | 75,0 | 26,8 | 17,9 | 127 |
| Șase luni | 44 | 738 | 5,4 | 13,5 | 2,5 | 73,3 | 18,7 | 22,4 | 130 |
| Douăsprezece luni | 53 | 843 | 7,3 | 6,8 | 1,2 | 67,7 | 16,3 | 18,0 | 110 |
| Adultă (după vîrsta de doi ani) | 66 | 477 | 9,4 | 5,2 | 1,3 | 63,0 | 18,1 | 14,5 | 102 |

* Microscopie directă

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

această perioadă, populațiile de microorganisme indigene rămîn stabile (neinfluențate de microorganismele în tranzit, nesemnificative numeric și funcțional), deși la fiecare furajare se adaugă noi nutrienți și un inoculum microbian nou. Unele condiții de mediu (pH și $E_h$) sînt, de asemenea, stabilizate. În cazurile în care animalele sînt hrănite cu o dietă constantă, numărul bacteriilor atinge $10^{10}$ — $10^{11}$ celule/ml, respectiv o densitate asemănătoare celei obținute în condiții optime în culturile de laborator. Aceasta ar corespunde, după Bueno și Escuola (1980), la ~1 kg celule bacteriene per rumen la bovine.

Deși reprezintă o formă de cultură continuă, microbiota ruminală nu ajunge, niciodată, un stadiu de echilibru, în sensul în care acest termen este folosit pentru culturile continue de laborator.

Comunitatea de climax include bacterii celulozolitice *(Bacteroides* sp., *Ruminococcus* sp.), amilolitice *(Selenomonas)*, metanogene *(Methanobacterium)*, hemicelulozolitice *(Butyrivibrio)*, proteolitice *(Veillonella)* etc. (tabelul nr. 61). Protozoarele care apar tardiv, după instalarea populațiilor

*Tabelul nr. 61*

**Principalele specii de bacterii din rumen și activitățile lor biochimice**
(după Hespell, 1987)

| Specia | Funcția în rumen * | Produșii fermentației** |
|---|---|---|
| *Ruminococcus albus* | C, X | F, A, E |
| *Ruminococcus flavefaciens* | C, X | F, S |
| *Butyrivibrio fibrisolvens* | C, X, PR, A, L, UGS,UA | F, A, B, L |
| *Bacteroides succinogenes* | C | F, S, |
| *Bacteroides amylophilus* | A, PR | F, A, S |
| *Bacteroides ruminicola* | A, X, P, PR, UGS | F, A, S |
| *Selenomonas ruminantium* | A, UGS, UG, UL, LP | F, A, L, P |
| *Anaerovibrio lipolytica* | L, UG | A, P, S |
| *Lachnospira multiparus* | P, A, PR | F, A, L, E |
| *Succinivibrio dextrinosolvens* | D, P | F, A, S |
| *Streptococcus bovis* | A, UGS, PR, LP | F, A, L |
| *Wolinella succinogenes* | UH | S |
| *Methanobrevibacter ruminantium* | UH, M | M |
| *Methanosarcina barkeri* | UH, UA, M | M |

* C, celulozolitic; X, xilanolitic; P, pectinolitic; A, amilolitic; D, dextrinolitic; L, lipolitic; PR, proteolitic; UGS, utilizează glucidele solubile; UG, utilizează glicerolul; UL, utilizează lactatul; UH, utilizează hidrogenul; UA, utilizează acetatul; LP, lactogen; M, metanogen.

** F, formiat; A, acetat; P, propionat; L, lactat; S, succinat; B, butirat; E, etanol; M, metan.

bacteriene, includ, de asemenea, specii care digeră celuloza (*Polyplastron multivesiculatum*), amidonul, pectinele, hemiceluloza ș.a.

Microorganismele din rumen prezintă o mare toleranță la concentrații mari de acizi grași volatili (100—150 mM) și de sare (50—60 g NaCl/kg). Marea complexitate a microbiotei asigură animalelor capacitatea de a consuma o mare diversitate de nutrienți cu compoziții chimice diferite. În acest context este de menționat faptul că proporția relativă a populațiilor fiziologic diferite se modifică în funcție de natura materialelor ingerate.

### Factorii care influențează compoziția și dinamica activității comunităților de microorganisme din rumen

Aceștia sînt relativ puțin cunoscuți și variabili de la o specie la alta. Au fost semnalate variații determinate de natura hranei și de ritmul de administrare, de fluxul de salivă, de capacitatea de legare a bacteriilor de particulele alimentare și de asocieri cu populațiile de celule aderente (Hespell, 1987). Numărul bacteriilor este mare la 4—5 ore după alimentare și mic după o oră și respectiv 7 ore.

Modificarea bruscă a regimului alimentar, ca, de exemplu, cea consecutivă trecerii de la stabulație la pășunat în cîmp, este urmată de producerea excesivă de gaze, în special de metan, cu fenomene brutale de meteorism. Acumularea lor, consecutivă incapacității de eructație, determină distensia și creșterea presiunii în rumen, cu compresiune pe plămîni. Dacă nu este suprimată, prin drenarea gazelor, acest fenomen poate determina moartea animalelor. După Williams (1984), fenomenul ar fi corelat cu capacitatea protozoarelor de a stoca polizaharide intracelulare.

### Particularitățile rumenului ca ecosistem

Rumenul se comportă ca un recipient anaerob în care constituenții din alimentație sînt fermentați de o comunitate complexă de microorganisme — microbiota ruminală — atît de versatilă încît poate ataca întreaga gamă de substanțe vegetale, chiar dacă conțin compuși neadecvați sau doar cu mică valoare nutritivă pentru alte animale (Kurihara și colab., 1968). Datorită acestor particularități, bovinele se comportă ca adevărate fermentatoare vii, mobile, comestibile, care se înmulțesc singure (Kirschbaum, 1972).

Mediul ruminal este un produs rezultat atît din contribuția microorganismelor, cît și a gazdei. El se comportă ca un sistem strict anaerob, datorită numărului mare de interacțiuni complexe dintre microorganisme și volumului mare de gaze formate: $CO_2$ (~72—75%), metan (~25%) și cantități variabile de $N_2$.

Lichidul ruminal are un pH = 5,5, relativ constant, datorită, pe de o parte, efectului-tampon exercitat de fluxul continuu de salivă (60 l/zi la bovine mature), care este o soluție salină diluată de $CO_3HNa$ și fosfat de Na, și, pe de alta, absorbției continue în circulația sanguină a metaboliților acizi (acizi grași volatili) rezultați din fermentație. El prezintă variații diurne în raport cu perioada de recoltare a probei: este mai scăzut cînd fermentația este la maximum și cînd cantitatea de amidon și glucide solubile din alimentație este mai mare.

## Rolul microorganismelor din rumen

Caracteristica fundamentală a ecosistemului ruminal este dependența sa de acțiunea microorganismelor ca agenți determinanți ai digestiei.

După cum este cunoscut, la rumegătoare, hrana urmează un anumit circuit: după fragmentare, prin masticație, și amestec cu salivă (umezirea favorizează atacul microorganismelor), alimentele trec în rumen unde microbiota respectivă inițiază procesul de fermentație. Evoluția acestuia este favorizată de mișcările imprimate de contracția mușchilor rumenului, care asigură omogenizarea amestecului și, de asemenea, favorizează acțiunea microorganismelor. Ulterior, masa alimentară este transferată în reticulum, unde este separată în mici porții — „ghemuri" —care sînt regurgitate în cavitatea bucală pentru re-masticație și divizare în fragmente tot mai mici (cu suprafață mare de atac pentru microorganisme). Acestea trec direct în reticulum, în omassum, apoi în abomassum și din acesta, prin duoden, în intestin (fig. 281).

Digestia ruminală a materiilor vegetale este rezultatul unor procese complexe, care implică participarea a numeroase microorganisme și enzime.

Microorganismele fibrolitice degradează polizaharidele vegetale în diferite grade, în funcție de structura lor chimică: pereții celulelor vegetale în proporție de 60%, celuloza 58—80%, hemicelulozele/xilanii 49%, amidonul 75%, constituenții celulari 98%, proteinele 88%, lignina 0% (Hespell, 1988). În acest proces, *Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes*, *Ruminicoccus albus* și *R. flavefaciens*, ca și unele protozoare sînt răspunzătoare, în cea mai mare măsură, de degradarea și fermentația celulozei. Ele pot participa, alături de *Butyrivibrio fibrisolvens* (slab celulozic) și de unele tulpini de *Bacteroides ruminicola*, și la digestia hemicelulozelor. Rezultă, inițial, celobioză și glucoză, care apoi suferă fermentația anaerobă, cu producere de oligozaharide solubile, utilizabile de cele mai multe microorganisme ruminale.

În cazul bovinelor, sub acțiunea enzimelor extracelulare, produșii finali ai fermentației substanțelor complexe sînt o serie de acizi grași volatili cu lanț scurt, în principal acetat (40—80% din total), propionat (13—42%), butirat (3—18%) și, în plus, cantități mici de acizi izobutiric, izovaleric, valeric, caproic și heptanoic (tabelul nr. 62). Este eliberată o cantitate mare de gaze (60—80 l/zi la bovinele mature), care sînt eliminate prin eructație. Dintre acestea, 60—70% sînt reprezentate de $CO_2$, iar restul de metan.

*Tabelul nr. 62*

**Producția zilnică de acizi grași volatili prin acțiunea microorganismelor din rumen** (după Wolin, 1981)

| Tipul de acid | Bovine | Ovine |
|---|---|---|
| Acetic | | |
| Moli/rumen | 62 | 4,4 |
| Kg/rumen | 3,7 | 0,26 |
| Propionic | | |
| Moli/rumen | 15 | 1,1 |
| Kg/rumen | 1,1 | 0,08 |
| Butiric | | |
| Moli/rumen | 7,7 | 0,5 |
| Kg/rumen | 0,6 | 0,04 |

Tabelul nr. 63 prezintă, după Hungate (1960), cantitățile relative ale diferiților produși ai metabolismului glucidic și reacțiile biochimice corespunzătoare desfășurate în rumenul de oaie.

Acizii grași volatili sînt rapid absorbiți în circulația sanguină și utilizați de animal, după cum urmează:

1) acetatul reprezintă sursa majoră de energie;

2) propionatul este singurul acid gras volatil care poate fi convertit la glucide prin procesul de gluconeogeneză. După Bueno și Escoula (1980), o vacă de 500 kg poate sintetiza zilnic aproximativ 1 kg de lactoză (corespunzător la 30 l de lapte), pornind de la acizii grași volatili care trec prin peretele rumenului;

3) butiratul este utilizat pentru sinteza de acizi grași.

*Tabelul nr. 63*

**Produșii derivați din fermentația unui kg de hrană în rumenul de oaie**
(după Hungate, 1960)

| Greutatea hranei digerate | Compușii chimici | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $CH_4$ | $CO_2$ | Acid acetic | Acid propionic | Acid butiric |
| 1 kg | 1,69moli<br>27 g | 3,3 moli<br>145 g | 2,88 moli<br>173 g | 1,11 moli<br>82 g | 1,06 moli<br>93 g |

*Metabolismul N* este complex și puțin cunoscut. Proteinele din alimentele care intră în rumen sînt hidrolizate de microorganisme la peptide, aminoacizi și $NH_3$.

Presupunînd degradarea alimentelor la nivel de trioze, relația stoichiometrică derivată din datele de mai sus este următoarea:

$$57 \text{ trioze} + 57\ H_2O \rightarrow 57 \text{ acid acetic} + 57\ CO_2 + 114\ H_2$$
$$22 \text{ trioze} + 22\ H_2 \rightarrow 22 \text{ acid propionic} + 22\ H_2O$$
$$42 \text{ trioze} \rightarrow 21 \text{ acid butiric} + 42\ CO_2 + 42\ H_2$$
$$33{,}5\ CO_2 + 134\ H_2 \rightarrow 33{,}5\ CH_4 + 67\ H_2O$$

$$121 \text{ trioze} \rightarrow 57 \text{ acid acetic} + 22 \text{ acid propionic} + 21 \text{ acid butiric} + 65{,}5\ CO_2 + 33{,}5\ CH_4 + 32\ H_2O$$

Cantități importante de $NH_3$ intră în venele ruminale, dar nu sînt regăsite în sînge deoarece sînt convertite, în ficat, la uree. O parte din azotul care a urmat această cale revine în rumen fie direct, din circuitul sanguin, fie pe calea salivei, ca uree. În sfîrșit, o parte din uree greu de cuantificat este eliminată prin urină. Ureea provenită din sînge, reintrată în rumen, ca sursă neproteică de N cu saliva, este convertită la $NH_3$ și $CO_2$.

Simultan cu aceste reacții degradative, la nivelul rumenului are loc o sinteză de proteine microbiene, de la peptide, aminoacizi și $NH_3$, care amplifică mărimea biomasei de microorganisme. În același timp, există o trecere continuă de proteine alimentare nedigerate, de proteine microbiene și

de N neproteic de-a lungul sistemului digestiv în abomassum și intestin, unde sînt hidrolizate la aminoacizi, care sînt absorbiți în organism. Williams (1984) apreciază că aproximativ 40—60% din proteinele din alimentație sînt degradate, iar produșii lor, folosiți pentru sinteze celulare. Prin acest proces, proteina cu valoare nutritivă redusă din masa alimentară este convertită la proteină microbiană cu valoare mult mai ridicată. Figura 282 prezintă sintetic cîteva dintre interacțiunile cunoscute din cadrul metabolismului N.

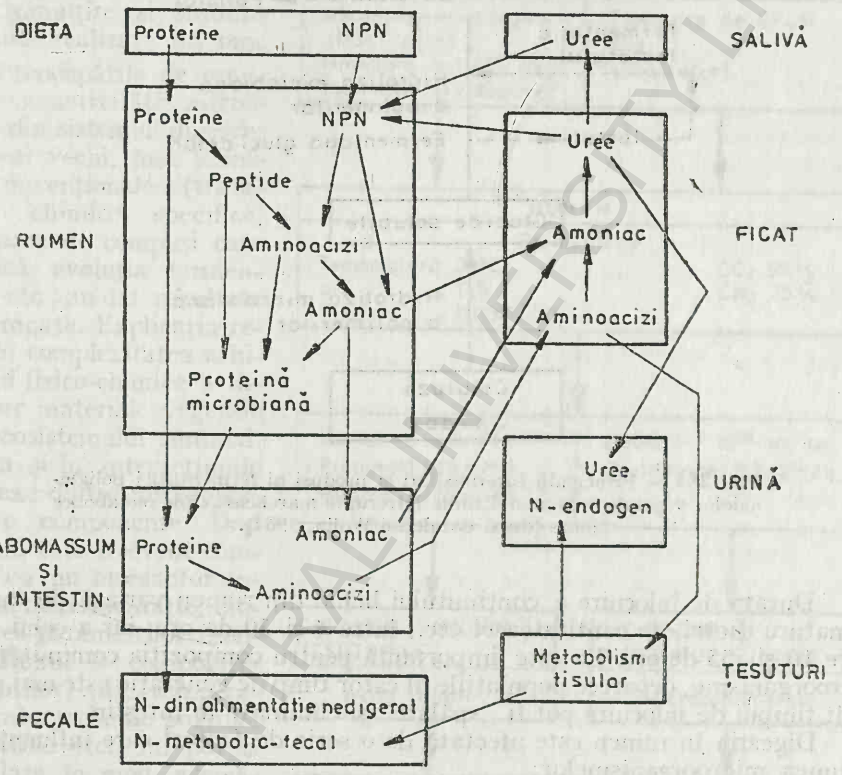



Fig. 282. — Metabolismul azotului la rumegătoare: NPN = azot neproteic (după Lewis și Swan, 1971).

Marston (1948), analizînd bilanțul energetic din rumen apreciază că numai ~6% din energia consumată este pierdută sub formă de căldură, deși ea nu este risipită pentru că ajută la menținerea temperaturii corpului. Aproximativ 84% este regăsită în produșii de fermentație (acizii grași volatili și $CH_4$) (fig. 283).

În sfîrșit, 10% din energie și o parte din produșii rezultați din fermentație sînt folosiți pentru a forma mari cantități de microorganisme care asigură continuarea fermentației. O parte sînt prădate de protozoare și devin după digestie în abomassum și intestin sursă majoră de nutrienți și vitamine (în special din grupul B) pentru animalul-gazdă. Figura 284 prezintă sintetic aceste transformări ale alimentelor de-a lungul sistemului digestiv, inclusiv valorificarea produșilor rezultați din activitatea microorganismelor.

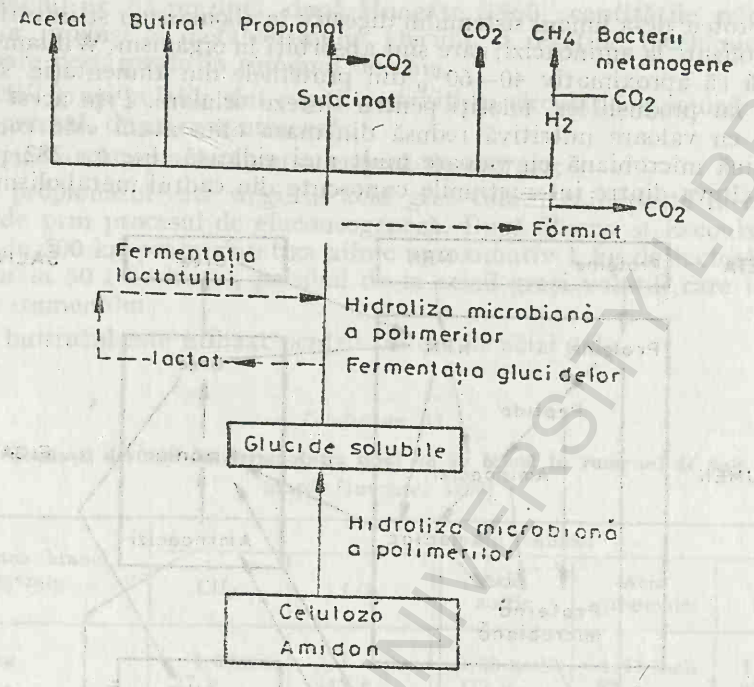



Fig. 283. — Principalii intermediari și produși ai fermentației poliglucidelor vegetale în rumen. Liniile întrerupte marchează căile metabolice minore (după datele lui Wolin, 1981).

Durata de înlocuire a conținutului lichid din rumen variază, în funcție de natura dietei, de cantitatea ei etc., între 4 și 30 de ore, iar a celui solid între 10 și 55 de ore. Ea este importantă pentru compoziția comunității de microorganisme, deoarece populațiile al căror timp de generație este mai mare decît timpul de înlocuire pot fi „spălate" și eliminate în intestin.

Digestia în rumen este afectată de o serie de factori care influențează acțiunea microorganismelor:

1) Frunzele, tulpinile și semințele sînt forme fizice cu conținut diferit de fibre. Ca urmare, ele sînt mărunțite în grade diferite, înainte de ingerare și suferă o digestie ruminală diferită în funcție de mărimea particulelor, de compoziția chimică, uneori, complexă și diferită de la o plantă la alta. Astfel, spre exemplu, hemicelulozele conțin proporții variabile de la o plantă la alta de arabinoză, glucoză, galactoză, ramnoză și acizi uronici.

2) În general, plantele tinere sînt digerate mai ușor, deoarece conțin mai multe substanțe solubile, mai mult amidon și pectine și mai puține fibre și lignină (Hespell, 1988).

### Posibilități de ameliorare a performanțelor microorganismelor din rumen

După cum remarcă Hespell (1987), deși co-evoluția microorganisme — animale durează de aproximativ 60—70 milioane de ani, selecția naturală

nu a asigurat instalarea celor mai eficiente comunități de microorganisme în rumen. Cele existente nu acționează în condiții optime și, ca urmare, o parte semnificativă din potențialul nutritiv al hranei este irosit sub forma unor produși fără importanță sau este eliminată nedigerată prin fecale. Este probabil că această situație se datorează, cel puțin parțial, faptului că aceste animale nu sînt rezultatul selecției naturale pure, ci și al unor programe de creștere, înmulțire și hrănire intensivă realizate de om.

Preocupările de ameliorare a activității microbiotei din sistemul digestiv sînt mai vechi, însă tehnicile convenționale (tratamente chimice specifice, adăugarea de compuși care modifică evoluția fermentației etc.) au dat rezultate neînsemnate. Explicația rezidă în complexitatea arhitecturii fizico-chimice a diferitelor materiale vegetale și a ecosistemului ruminal, precum și în interacțiunile complexe dintre microorganismele componente. Deși rumenul este frecvent comparat cu un bioreactor industrial de fermentație, majoritatea parametrilor esențiali (fluxul și compoziția nutrienților, pH, temperatura, interacțiunile pozitive și negative etc.) nu pot fi controlate în mod asemănător.

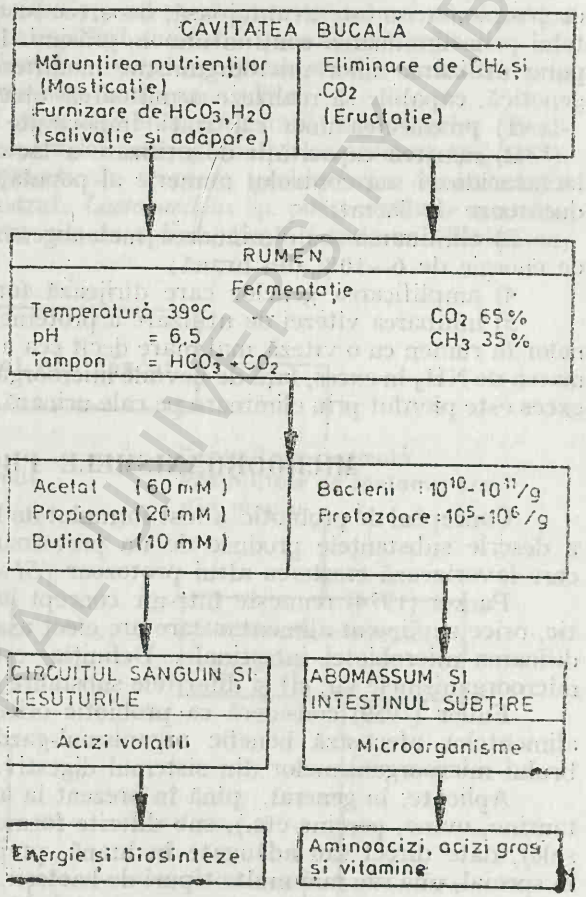



Fig. 284. — Reprezentarea schematică a etapelor de conversie a hranei în produși animali la rumegătoare, cu evidențierea transformărilor efectuate în rumen (după Wolin, 1981).

Pornind de la premisa că producerea de $CH_4$ și eliminarea lui prin eructație reprezintă o pierdere de ~10% din energia disponibilă pentru rumegătoare, s-a încercat utilizarea unor tehnici de diminuare a producerii de $CH_4$ și de creștere simultană a eliberării de acizi grași volatili, care asigură o utilizare mai economică a hranei. Perry și colab. (1976) au demonstrat că adăugarea antibioticului ionofor *monensina* în alimentație crește randamentul formării de propionat și scăderea $CH_4$ din rumen. Animalele utilizează mult mai eficient hrana, consumă mai puțin decît martorii, dar cîștigă în greutate cu aceeași rată. Este probabil că monensina modifică fermentația din rumen,

prin selecționarea populațiilor de microorganisme care produc mai mult propionat și mai puțin $H_2$. Scăderea concentrației de $H_2$ are drept consecință diminuarea producerii de $CH_4$ (bacteriile metanogene obțin energia pentru creștere utilizînd $H_2$, pentru a reduce $CO_2$ la $CH_4$). De aceea, $H_2$ nu se acumulează niciodată în rumen.

Tratarea cu monensine sau cu alte substanțe care măresc producerea de propionat nu este avantajoasă, deoarece scade valoarea comercială a laptelui prin diminuarea conținutului în grăsimi. De aceea, Hespell (1987) propune utilizarea unor microorganisme modificate prin tehnici de inginerie genetică, capabile să realizeze următoarele obiective:

1) producerea unor cantități importante de amilaze și xilanaze;

2) mărirea capacității de utilizare a lactatului, în vederea diminuării lactatacidozei sau controlul numeric al populațiilor de microorganisme producătoare de lactat;

3) eliminarea sau diminuarea metanogenezei care înseamnă o pierdere de energie de 6—10% din hrană;

4) amplificarea genelor care dirijează formarea propionatului;

5) inhibarea vitezei de utilizare a proteinelor. Digestia rapidă a proteinelor în rumen cu o viteză mai mare decît cea a protozoarelor determină formarea de $NH_3$ în exces, față de nevoile microorganismelor și animalului. Acest exces este pierdut prin eliminare pe cale urinară.

## MICROORGANISMELE PROBIOTICE

Conceptul de probiotic a fost formulat de Lilly și Stillwell (1965) pentru a descrie substanțele produse de un protozoar *(Tetrahymena pyriformis)*, care favorizează creșterea altui protozoar *(Stylonychia* sp.) (fig. 84).

Parker (1974) reunește într-un concept larg, sub denumirea de probiotic, orice supliment alimentar care are efect asupra gazdei animale, prin modificarea microbiotei intestinale. Definiția este imprecisă și include atît microorganismele vii, cît și diferitele substanțe (inclusiv antibioticele).

Fuller (1989) consideră ca probiotic orice organism viu care adăugat alimentelor afectează benefic organismul-gazdă, prin ameliorarea echilibrului microorganismelor din sistemul digestiv.

Aplicate, în general, pînă în prezent la animale de crescătorie (păsări, taurine, ovine, porcine etc.), sub diferite forme (granule, pudră, pastă, capsule), date direct sau adăugate în hrană, preparatele probiotice utilizează, în special, una sau mai multe tipuri de bacterii, ca, de exemplu: *Lactobacillus bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. helveticus, L. lactis, L. salivarius, L. plantarum, Bifidobacterium* sp., *Streptococcus thermophilus, Enterococcus hirae* etc.

**Caracteristicile unui bun probiotic** însumează:

1) lipsa de patogenitate și toxicitate;

2) capacitatea de a supraviețui și de a fi metabolic activ în mediul intestinal;

3) să exercite efecte benefice asupra organismului-gazdă (să asigure creșterea sporită, să mărească rezistența la infecție);

4) să fie accesibil din punct de vedere economic;

5) să fie stabil pe durate mai mari (pentru conservare).

Modul de acțiune al probioticelor este relativ puțin cunoscut. Au fost identificate cel puțin trei căi majore:

1) Efectul direct, antagonist, materializat prin scăderea numărului unor grupe specifice de microorganisme prin: a) producerea de metaboliți de tipul acizilor organici (și scăderea de pH), $H_2O_2$ sau producerea de substanțe macromoleculare cu acțiune antimicrobiană; b) competiție pentru nutrienți; c) împiedicarea colonizării bacteriilor patogene prin competiție pentru situsurile de adeziune de pe suprafața epiteliilor intestinale. Experimental, s-a demonstrat că *Lactobacillus* sp. aderă de peretele intestinal, rezistînd la îndepărtare la cel puțin patru spălări succesive cu soluție tampon.

2) Modificarea metabolismului microorganismelor din intestin prin creșterea activității unor enzime sau diminuarea altora.

3) Stimularea imunității prin creșterea activității macrofagelor (Bealmer și colab., 1984) sau a concentrației imunoglobulinelor-anticorp (fig. 285). Efectele sistemice sînt condiționate de trecerea probioticelor în circulația generală. După cum s-a demonstrat, *Lactobacillus* sp. poate străbate mucoasa intestinală, supraviețuind cîteva zile în splină, ficat și pulmon (Bloksama, 1981; Berg, 1983).

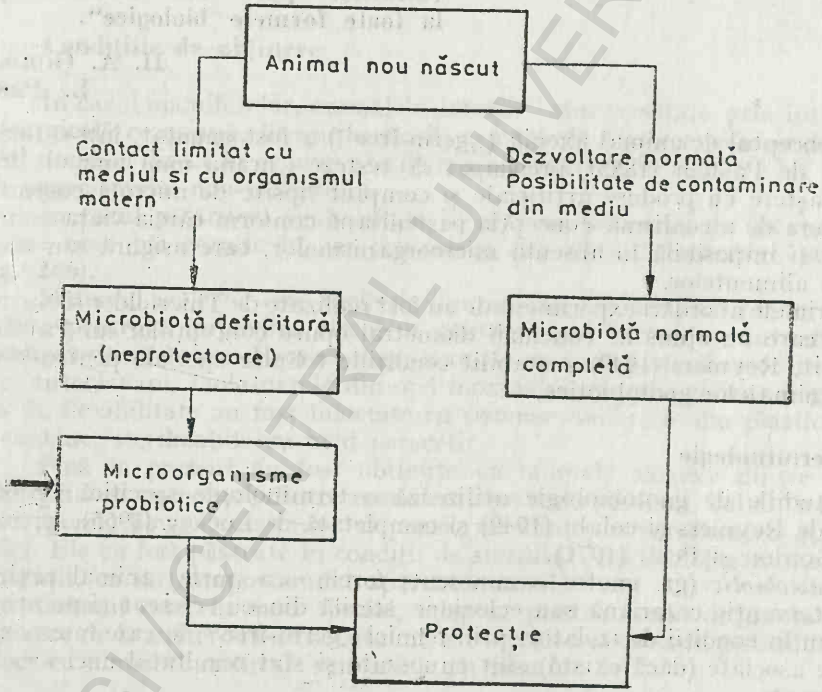



Fig. 285. — Reprezentarea schematică a modului de intervenție al microorganismelor probiotice.

**Efectele produselor probiotice** sînt, în principal, următoarele:

1) Stimulează creșterea animalelor prin îmbunătățirea conversiei hranei și oferă protecție față de infecțiile intestinale (reducerea morbidității și a mortalității).

2) Înlocuiesc antibioticele și aditivii chimici sintetici la animalele de crescătorie.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3) Atenuează fenomenele de intoleranță la lactoză, determinate de deficiența congenitală în β-galactozidază prin creșterea activității acestei enzime.

4) *Lactobacillus* sp. exercită un efect anticancerigen prin: a) inhibarea creșterii celulelor tumorale; b) supresia bacteriilor care produc enzime (β-glucuronidază, azoreductază etc.) răspunzătoare de eliberarea de substanțe cancerigene din complexe inofensive; c) determină supresia nitroreductazei implicată în sinteza nitrozaminelor (Goldin și Gorbach, 1984; Fuller, 1989).

## GNOTOBIOZA ȘI ANIMALELE GNOTOBIOTICE

**„Animalele gnotobiotice, trăind fie în absența, fie în asocierea unor agenți vii heterologi cunoscuți, reprezintă o extindere a conceptului culturilor pure din microbiologie la toate formele biologice".**

H. A. Gordon
L. Pesti

Conceptul de animal axenic („germ-free") a fost enunțat, într-o formă inițială, de Pasteur (1885), preocupat să testeze „hrana unui animal tînăr de la naștere cu produse artificiale și complet lipsite de microbi comuni". Scopul era de a confirma concepția pasteuriană conform căreia viața animalelor ar fi imposibilă în absența microorganismelor, care asigură sau ajută digestia alimentelor.

Primele abordări experimentale au fost realizate de Thierfelder și Nuttall (1895), care au ajuns la concluzii diametral opuse concepțiilor lui Pasteur. În sfîrșit, Reyniers (1949) a stabilit condițiile tehnice speciale pentru obținerea animalelor gnotobiotice.

### Terminologie

Studiile de gnotobiologie utilizează o terminologie specifică propusă inițial de Reyniers și colab. (1949) și completată de Luckey (1965), precum și de Gordon și Pesti (1971).

*Gnotobiotic* (gr. gnotos = cunoscut; forein = a purta) animal obținut prin intervenție cezariană sau ecloziune sterilă din ou, crescut și menținut continuu în condiții de izolator, prin tehnici „germ-free", în care microorganismele asociate (dacă există) sînt cunoscute și sînt rezultatul unei asocieri intenționate.

*Gnotobiologie* — biologia sistemelor în care sînt prezente numai specii cunoscute.

*Axenic (steril, monognotobiotic sau „germ-free")* — animal lipsit de orice microorganism viabil (bacterii, microfungi sau protozoare). Datorită limitelor proceselor actuale de detectare, termenul nu se referă la virusuri care pot exista în stare latentă consecutiv transmiterii transplacentare.

*Gnotofor* — animal purtător al unei (unor) specii cunoscute de microorganisme, inoculate în mod deliberat, în absența altor microorganisme vii demonstrabile.

*Monognotofor* (sin. dibiotic) — animal axenic inoculat cu o singură specie cunoscută de microorganisme. Atît gazda, cît și microorganismul sînt părți ale unui sistem dibiotic.

*Dignotofor* (sin. tribiotic) — animal axenic inoculat cu două specii de microorganisme cunoscute.

*Microorganisme asociate* — microorganisme comensale în asociere cu gazda, în tractul digestiv, în bronhii, pe tegumente etc.

*Convențional* — animal obișnuit, crescut în condiții obișnuite. În gnotobiologie, animalele convenționale din aceeași specie, cu același fond genetic, hrănite cu aceeași dietă sterilizată, dar trăind în mediu deschis, sînt folosite ca martori pentru compararea cu animalele „germ-free".

*Convenționalizate* (sin. „ex.-germ-free") — animal axenic trecut în condiții libere și asociat cu microorganismele prezente la organismele-martor convenționale.

*SPF* („Specific pathogen-free") — animale purtătoare ale unei microbiote convenționale normale, în absența oricărui microorganism patogen cunoscut (Dubos, 1962; Foster, 1963).

### Condițiile de obținere

În cazul mamiferelor, animalele „sterile" sînt recoltate prin intervenție chirurgicală cezariană, în spațiu steril, urmată de histerectomie și de transferul uterului direct în camera sterilă a unui izolator, în care are loc eliberarea organismului nou-născutului.

În cazul păsărilor, ouăle aflate la sfîrșitul perioadei de incubare sînt supuse unei băi germicide, iar ecloziunea are loc în dispozitivul sterilizat (fig. 286).

Sistemul izolator este alcătuit din mai multe compartimente ermetic închise pentru a împiedica riscul de contaminare, în care se introduce aer sterilizat prin filtrare. Hrana și apa sînt, de asemenea sterilizate, de regulă, prin autoclavare. Izolatoarele din oțel inoxidabil, cu preț ridicat și grad redus de flexibilitate au fost înlocuite cu sisteme construite din plastic, sticlă și cauciuc, sterilizabile cu acid peracetic.

Pînă în prezent au fost obținute ca animale axenice dintre păsări: rațe, găini și prepelițe; dintre mamifere: șoareci, șobolani, cobai, iepuri, oi, cîini, porci, bovine, maimuțe și ponei, iar dintre nevertebrate: gîndaci și melci. Ele au fost păstrate în condiții de sterilitate microbiologică mai multe generații, cu un comportament aparent normal.

Cobaiul este, în mod special, adaptat pentru studii de gnotobiologie deoarece de la naștere nou-născutul nu are o perioadă de supt, putînd fi hrănit direct cu alimente naturale semisolide sterilizate.

## CARACTERISTICILE ANIMALELOR „GERM-FREE"

Animalele axenice sînt, în esență, animale normale, care diferă de cele convenționale prin absența miliardelor de microorganisme ce formează microbiota normală.

Din punctul de vedere al aspectului, al vitezei de creștere, al capacității de reproducere și al longevității sînt comparabile celor convenționale sau chiar superioare. Observațiile asupra mai multor specii au arătat că fenome-

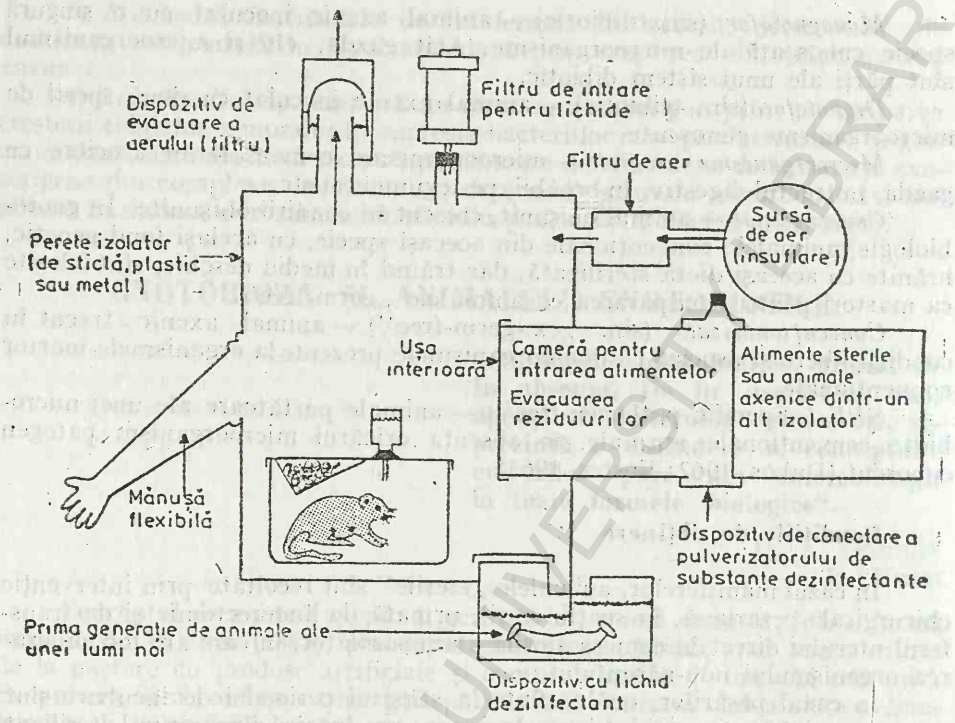



Fig. 286. — Secțiune transversală printr-un sistem izolator utilizat în studiile cu animale axenice („germ-free") (după Pleasants, 1973).

nele de îmbătrînire sînt mai lente, iar în unele cazuri (șoareci din linia Swiss Weber, găini, maimuțe etc.), durata vieții este prelungită.

Cu toate acestea, absența microorganismelor are o serie de efecte directe sau indirecte, locale sau generale, care afectează unele particularități anatomice, fiziologice sau imunobiologice. Ele nu au un caracter de generalitate în sensul că există particularități tipice fiecărei specii în parte.

**Particularități structurale.** Deși aspectul global al celor două tipuri de animale este, în mare, asemănător sub aspect morfologic, pot fi întîlnite două cazuri particulare:

1) Organele care sînt în contact continuu și intim cu microorganismele sau cu antigene provenite din acestea (ficatul, intestinul subțire, ganglionii limfatici etc.) sînt mai mari și mai active la animalele convenționale decît la cele axenice. Intestinul subțire este mai lung (raportat la lungimea corpului, are mai mult țesut conjunctiv și mai puțin epitelial decît la cele „germ-free", iar ganglionii limfatici sînt mai mari și vor conține mai multe limfocite la animalele convenționale comparativ cu cele axenice.

2) A doua particularitate se referă la structuri mai mici la animalele convenționale decît la cele „germ-free". Acestea includ cecum-ul la rozătoare și gușa, oasele și intestinul gros la puii de găină.

Fenomenul cel mai mult studiat este cel de mărire a cecum-ului la șoarece, șobolan și cobai. La șobolanul axenic, greutatea cecum-ului repre-

zintă 25—30% din greutatea corpului, față de numai 8,6% la animalele convenționale, iar conținutul său este de peste 5 ori mai mare ca la animalele normale. Peretele destins al cecum-ului reprezintă 5% din greutatea corpului față de 0,2% la animalul normal. Conținutul mare de lichid în cecum și colon, care determină și o ușoară diaree cronică, ilustrează existența unor perturbări (inhibări) a absorbției apei în intestin. Este probabil că la animalele convenționale substanța inhibitoare este distrusă de microorganismele intestinale. Datorită pierderii tonusului mușchilor intestinali, cecum-ul mărit are tendința de răsucire provocînd suspendarea fluxului sanguin și alimentar prin volvulus la joncțiunea ileo-cecalo-colică, urmată evident de moarte.

Fenomenele revin la normal atît din punct de vedere anatomic, cît și funcțional după „conventionalizarea" animalului axenic prin monoinoculare cu *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis* etc. Aceste date, ca și dimensiunile normale puțin diferite ale cecum-ului (care demonstrează necesitatea unei umpleri și evacuări continue) sugerează că microbiota normală ar avea rolul esențial de asigurare a tonusului peretelui intestinal. Acest rol s-ar realiza prin producerea de către microorganisme a unei substanțe presoare (tonusul poate fi restabilit prin tratare cu filtrat de conținut cecal de la un șobolan convențional) sau prin îndepărtarea unor substanțe care pot bloca acest efect.

**Modificări fiziologice.** Cecum-ul mărit, rezultat direct al absenței microorganismelor, determină o serie de perturbări prin mecanisme secundare nebacteriene.

Pleasants (1973) citează faptul că metabolismul bazal și fluxul sanguin sînt diminuate cu 25% la șobolanul axenic comparativ cu animalul convențional. Wortmann și colab. (1973) au demonstrat că la animalele axenice conținutul cecal acumulează un pigment provenit, probabil, din celulele mucoasei detașate în lumen. Absorbit în sînge, acest pigment ar avea un efect antiadrenergic asupra pereților vasculari. Cecum-ul animalelor convenționale conține numai 1/10 din acest pigment, excedentul fiind probabil distrus de microorganisme.

Dejecțiile animalelor axenice lipsite de putrefacții și fermentații nu au miros fecaloid și amoniacal, iar carnea celor comestibile este lipsită de gust și de miros.

Sub raportul funcțiilor fiziologice principale (respirație, circulația sîngelui, digestie, excreție, mobilitate), animalele axenice sînt foarte asemănătoare celor convenționale. Utilizarea hranei se face cu o eficiență asemănătoare, la fel creșterea și reproducerea, dacă dieta este completă și asigură toate exigențele de vitamine.

## Imunobiologie

În timp ce mecanismele de apărare constitutive (pielea, mucoasele, sistemul complement, capacitatea de epurare — „clearing" — a sîngelui) sînt normale, animalele axenice au celelalte mecanisme de apărare specifică subdezvoltate: ganglionii limfatici sînt subdezvoltați, numărul limfocitelor în organe este redus, sistemul reticuloendotelial (fagocitar mononuclear) în peretele intestinal puțin dezvoltat. Ele își păstrează, totuși, potențialul nor-

mal de reactivitate, care poate fi demonstrat prin capacitatea de reacție promptă după monoinoculare.

Concentrația imunoglobulinelor este mică (numai 15—50% din normal), cele prezente corespunzînd antigenelor bacteriene sau de altă natură prezente în hrana sterilizată și capabile să inducă imunizarea după administrarea per orală.

Pleasants (1973) a obținut și animale cu o stare imunitară de bază lipsită de antigene („antigen-free") prin hrănire cu o dietă hidrosolubilă, sterilizată prin filtrare (aminoacizi, glucoză, vitamine, minerale etc.). În acest caz, concentrația imunoglobulinelor este nedetectabilă cu tehnicile actuale.

### Rolul microbiotei normale

Utilizarea experimentală a animalelor axenice a arătat că microbiota normală, în special cea intestinală, poate exercita mai multe efecte benefice asupra organismului-gazdă:

1) Așa cum o arată modificările anatomice și histologice observate la animalele axenice, microbiota este necesară pentru dezvoltarea organelor cu care vine în mod normal în contact. Aceasta ar fi corelată cu prezența unor stimuli fiziologici, încă neidentificați, legați de activitatea unor anumite microorganisme. Ca urmare, contaminarea per orală cu bacterii determină rapid la animalele pînă atunci axenice modificări în arhitectura și histologia intestinului, care, în timp scurt, recapătă aspectul caracteristic al intestinului animalelor convenționale.

2) Microorganismele intestinale sintetizează vitamine, ca: vitamina K, acidul folic, acidul nicotinic, biotina, riboflavina, piridoxina, tiamina și acidul pantotenic necesare în metabolismul organismului normal. Șobolanii axenici hrăniți cu alimente deficitare în vitamina K prezintă simptome de deficiență în 5—9 zile. Cu aceeași dietă, animalele convenționale prezintă coagulare normală. Transferul animalelor cu deficit de vitamină K în mediul normal deschis sau inocularea experimentală cu o tulpină de *Escherichia coli* sau *Sarcina* sp., care produc vitamină K, restabilesc coagularea în 48 de ore.

3) Microbiota normală stimulează mecanismele de apărare ale gazdei, determinînd o creștere relativ nespecifică a rezistenței acesteia la boală.

4) Activitățile metabolice ale microbiotei normale și interacțiunile lor cu microorganismele străine favorizează sănătatea gazdei, împiedicînd implantarea în special în intestin a unor microorganisme patogene.

5) Are rol în nutriție asupra produșilor rezultați din degradarea alimentelor, care nu pot fi atacați de complementul normal de sucuri digestive.

6) Microorganismele intestinale favorizează eliminarea fecală a colesterolului. Efectul global este echivalent cu diminuarea aportului de colesterol din alimentație.

Cu toate aceste efecte favorabile asupra organismelor animale, microbiota indigenă, deși interferă activ și pregnant cu diferite procese fiziologice, nu este esențială pentru existența gazdei și, ca atare, nu este indispensabilă vieții acesteia. Ea este însă necesară pentru dezvoltarea normală a organismelor animale, probabil datorită faptului că evoluția comună îndelungată a creat, în cursul evoluției, dependența acestora de anumiți stimuli fiziologici,

în special bacterieni. La ierbivorele rumegătoare, trăind în condiții naturale de hrană, microbiota intestinală este absolut necesară pentru digestie și, deci, pentru existența organismului, datorită lipsei celulazelor din sucurile digestive ale acestor animale a căror hrană, exclusiv vegetală, este în bună parte celulozică.

**Aplicații practice ale conceptului gnotobiozei și ale animalelor gnotobiotice**

În cercetarea experimentală clasică, interpretarea cu acuratețe a rezultatelor obținute implică raportarea lor la specie, linie genetică, sex, vîrstă și greutatea animalelor utilizate, tipul de creștere, dietă etc., condiții care reduc multe din variabilele inerente unui sistem biologic.

Rămîne un singur factor care nu poate fi controlat, reprezentat de microbiota „normală", asociată, totdeauna, cu animalul respectiv a cărui prezență benefică sau dăunătoare poate complica interpretarea datelor.

Gnotobioza caracterizează fie animalele lipsite complet de microorganisme și limitate exclusiv la propriile lor resurse, fie pe cele modificate de unele microorganisme cunoscute.

Deși reprezintă *per se* o condiție artificială, animalul axenic se comportă ca o „eprubetă vie" (Reyniers, 1959), ca un bun „mediu de cultură" chiar pentru microorganisme care nu cresc în animalele convenționale ale unei specii date.

Experimentarea gnotobiologică a permis unele abordări originale și descifrarea unor fenomene greu accesibile tehnicilor convenționale. Între acestea citățm:

1) Studiile de ecologia microorganismelor (ale interacțiunilor microorganism — gazdă) privind evoluția răspunsului biologic și a bolii în absența unor agenți exogeni (nutrienți, prezența altor microorganisme asociate, alte agresiuni) sau endogeni (răspunsul imun normal), care pot modifica rezistența și rezultatul infecției.

2) Rolul microorganismelor în cariogeneza dentară. Animalele axenice nu fac carii, indiferent de dietă, decît după ce sînt transformate în convenționale prin infectarea orală cu *Streptococcus mutans*.

3) Studiul efectelor oncogene ale unor virusuri.

4) În imunologia geriatrică, în vederea stabilirii rolului eventual al microorganismelor în declinul fiziologic al răspunsului imun la bătrîni. Studiile se bazează pe observația că șobolanii axenici în vîrstă de doi ani (aproximativ echivalenți fazei tardive de maturitate la om) nu prezintă leziuni degenerative la nivelul arterelor, al cordului, al rinichilor, al mușchilor etc.

5) Studiul exigențelor diferitelor specii animale pentru anumiți nutrienți esențiali și rolul microorganismelor rezidente normal în organismul animal pentru diminuarea sau creșterea acestor exigențe.

6) Stabilirea bazelor teoretice și practice ale protejării persoanelor imunosupresate și cu deficite imunitare grave. Astfel, pacienții supuși supresiei răspunsului imun după transplante de organe, pentru a preîntîmpina fenomenele de respingere, după ce sînt „sterilizați" prin administrarea de antibiotice cu spectru larg, sînt menținuți în boxe-izolatoare speciale, prevăzute cu bariere mecanice etanșe de material plastic, cu flux de aer steril,

laminar și sînt hrăniți cu alimente și apă sterilizate. În mod asemănător, copiii cu deficiențe imunitare congenitale (de exemplu, agamaglobulinemie) sînt protejați în perioada premergătoare grefei de măduvă a oaselor. Protecția este absolut necesară, în special în primele perioade după naștere, deoarece defectul genetic pare să fie reprezentat mai degrabă de o întîrziere și o lentoare a producerii anticorpilor. Frecvent ritmul de sinteză a anticorpilor revine spre normal după vîrsta de aproximativ doi ani.

7) Animalele SPF (lipsite de patogeni specifici) sînt utilizate în cercetarea biologică și în testarea medicamentelor noi.

8) În sfîrșit, experimentarea gnotobiologică a permis descifrarea rolului microbiotei naturale, caracteristică fundamentală a tuturor organismelor vii.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN CIRCUITUL GLOBAL AL MATERIEI ÎN NATURĂ

„Fără microbi, viața ar deveni imposibilă, pentru că aceiaşi moarte ar fi incompletă"...

L. PASTEUR

„În mod obişnuit, impactul imens pe care îl au microorganismele asupra chimiei pămîntului şi a transformărilor geochimice, cu rol critic sau esențial pentru continuarea existenței plantelor sau animalelor, este neluat în seamă".

M. ALEXANDER

„Pentru ca biosfera să-şi continue existența normală este necesar ca materialele importante din punct de vedere biologic să sufere modificări ciclice, în aşa fel, încît, după ce au fost utilizate, să se reîntoarcă cu un anumit consum de energie solară, într-o formă în care pot fi reutilizate"

G. E. HUTCHINSON

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN CIRCUITUL GLOBAL AL MATERIEI ÎN NATURĂ

În natură, organismele vii preiau în mod permanent din sol, din apă și din atmosferă, cantități mari de elemente pe care le folosesc pentru sinteza constituenților lor celulari și pentru obținerea energiei necesare manifestărilor lor biologice. Parțial, în cursul vieții lor și în cea mai mare parte după moarte, substanțele organice formate sînt supuse unui proces de mineralizare, iar elementele componente sînt redate rezervoarelor din care au provenit.

Circulația biogeochimică este dirijată direct sau indirect de energia radiantă solară, care este absorbită de organismele fototrofe (plante verzi, alge, bacterii fotosintetizante). Datorită capacității de a converti energia luminoasă în energie chimică, ele pot sintetiza substanțe organice pornind numai de la $CO_2$ atmosferic, apă și substanțe minerale. Dintre elementele componente ale acestor substanțe minerale, unele au un rol biologic primordial (C, N, O, H, S, P, Na, K, Fe), în timp ce altele sînt indispensabile numai în cantități foarte mici (Mn, Mg, Zn, Cu, Co, Mo, B etc.).

De la plante, substanțele organice astfel sintetizate sînt preluate sub formă de hrană de către animale și om, iar după moartea acestora se reîntorc în sol și în ape, în formă organică, neutilizabilă ca atare de către plante.

La această sărăcire a solului în substanțe anorganice se adaugă pierderile determinate de eroziune, fenomenele produse de vînt și ploi, de depunerea unor compuși minerali în sedimente și roci sedimentare sau stocate sub forme ce evoluează spre stadiul de combustibili fosili (cărbune, țiței etc.). Dacă acest proces ar fi continuu, cu toate că rezervele de elemente biogene existente în natură sînt foarte mari s-ar ajunge, la un moment dat, la epuizarea formelor utilizabile, situație incompatibilă cu existența organismelor vii. Acest fenomen este împiedicat de faptul că microorganismele din sol și din ape, exercitînd o puternică și permanentă acțiune de mineralizare a substanțelor organice de proveniență vegetală sau animală, mențin constituenții anorganici și organici din biosferă într-un raport relativ constant.

Chiar și în mediile acvatice, în care, după date mai noi, în procesul de remineralizare participă cu un rol important zooplanctonul, rolul bacteriilor și al fungilor rămînînd esențial datorită unor particularități unice: 1) caracter ubicuitar; 2) activitate metabolică intensă; 3) capacitate de multiplicare rapidă; 4) activitate degradativă marcată chiar asupra unor substanțe chimice complexe (celuloză, lignină, chitină) neobișnuite (hidrocarburi, fenoli etc.) sau „recalcitrante" (de sinteză).

**Ciclurile biogeochimice** însumează căile de circulație ale elementelor biogene în natură, prin care trec de la forma anorganică la forma organică,

respectiv la diferite combinații mai mult sau mai puțin complexe, pentru ca să revină la forma anorganică din compartimentul abiotic al habitatelor respective.

Evoluția acestor căi în care sînt implicate atmosfera, hidrosfera și litosfera implică intrarea în acțiune a numeroase etape intermediare de transformare, a unor reacții fizice (solubilizări, precipitații, volatilizări) și chimice (oxidări, reduceri, hidrolize), ca și activități biologice (degradări și mineralizări, conversie organică prin biosinteze), precum și prin translocări spațiale repetate:

$$\text{atmosferă} \leftrightarrows \text{apă}, \quad \text{atmosferă} \rightleftarrows \text{sol}, \quad \text{sol} \leftrightarrows \text{apă},$$
$$\text{apă} \leftrightarrows \text{sedimente}.$$

În unele cazuri, transformările ciclice sînt relativ simple din punct de vedere chimic, fiind limitate la simpla alternanță anorganic $\rightleftarrows$ organic.

În acest sens este caracteristic *ciclul fosforului*, care este preluat de organismele vii (microorganisme și plante) ca fosfat anorganic solubil și încorporat în compuși organici prin esterificarea ionului fosfat. După moartea organismelor, fosfatul organic eliberat este reconvertit la formele anorganice. În cursul acestui ciclu, atomul de P rămîne component al grupării fosfat. Circulația lui sub acțiunea microorganismelor nu îi modifică starea de oxidare (Stewart și McKercher, 1982). Transformările se reduc la trecerea de la fosfat anorganic la organic și invers, respectiv de la insolubil (imobilizat) la solubil și mobil (Atlas și Bartha, 1987).

Situația este diferită în cazul altor elemente (C, N, O, S etc.), la care conversia anorganic $\rightleftarrows$ organic este însoțită de modificări în starea lor de oxidare (și de valență) cu consecințe importante pentru utilizarea lor de către microorganisme.

În unele medii, indisponibilitatea elementelor citate nu este determinată de absența lor, ci de lipsa unor forme chimice accesibile (Alexander, 1971). Ca urmare, un hectar de sol poate să conțină 75 000 tone N și să fie, totuși, limitant pentru plante. Fracțiunea din azotul total prezent în biosferă disponibilă pentru a fi utilizată de plante variază între 0,00001 și 0,001%.

În sfîrșit, unele cicluri (spre exemplu, în ciclul carbonului) prezintă ceea ce Hutchinson (1970) a denumit *imperfecțiuni accidentale*, în sensul că permanent anumite cantități sînt depuse în forme relativ stabile, fiind scoase din circuit, fie pe termen mediu (ca în cazul humusului), fie pentru zeci și sute de milioane de ani, ca în cazul combustibililor fosili (fig. 287).

Diferitele forme chimice (organic, anorganic, solubil, insolubil) ale unui element formează *rezervoare*, a căror mărime poate fi aproximată atît la scară locală (la nivel de habitat) sau chiar extrapolată la nivel de biosferă. Între diferitele rezervoare prezente în atmosferă, litosferă sau hidrosferă există un flux continuu, care evoluează în funcție de viteza de reciclare a materialelor respective.

*Mărimea* rezervoarelor poate diferi mult de la un habitat la altul. Ele pot conține compuși ușor accesibili, expuși unor transformări rapide sau relativ inaccesibili, transformați lent. În funcție de condițiile locale, unele forme chimice pot fi pierdute, iar altele se pot acumula.

Mărimea diferitelor rezervoare determină viteza de turnover. În general, rezervoarele mici (ca, de exemplu, cel de $CO_2$) au un turnover rapid și în

mod deosebit sensibil la perturbări. Viteza cu care evoluează întregul ciclu depinde de mărimea rezervorului și de cea mai lentă viteză de turnover. În unele cazuri, viteza mică de degradare a unor substraturi (celuloză, hemiceluloză, lignină) determină o „strangulare" a fluxului și încetinirea lui globală (Alexander, 1971).

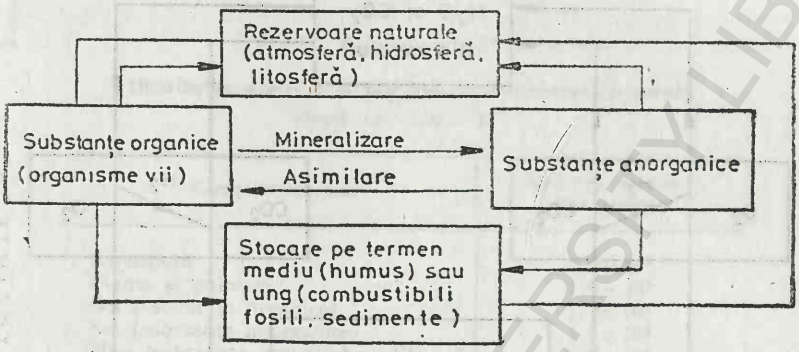



Fig. 287. — Model general simplificat privind circuitul biogeochimic în natură.

În unele cazuri, mărimea rezervorului este constantă în timp, datorită unei stări de echilibru, rezultată, în primul rînd, din faptul că pierderea este echilibrată de un influx aproximativ egal. Ca urmare, cantitatea de carbon organic, într-un teren virgin, este relativ constantă, deoarece pierderea de $CO_2$ este echilibrată de reîntoarcerea în formă de C organic ca litieră și țesut radicular mort.

La fel, pierderea de azot din ocean, rezultată prin depozitare în sedimente sau prin alte procese similare, este compensată prin fixarea de N atmosferic, aportul de compuși ai N aduși de ploi, proveniți din sol etc.

**Interconectarea ciclurilor biogeochimice.** Deși în mod convențional există o tendință de prezentare separată a ciclului diferitelor elemente biogene, ele sînt strîns interconectate și interdependente, realizînd, în ansamblu, ciclul global al materiei în natură. În acest sens există probe numeroase de la cele mai simple la cele mai sofisticate.

Bacteriile proteolitice, care descompun proteinele la $CO_2$, $NH_3$ și $H_2S$, sînt implicate în trei cicluri: C, N și S. În mod asemănător, *Thiobacillus denitrificans* participă în desfășurarea celor trei cicluri prin reducerea nitratului, oxidarea $H_2S$ și utilizarea energiei pentru reducerea $CO_2$ și sinteza de compuși organici ai carbonului.

Figura 288 prezintă interacțiunile dintre ciclurile C, O și al apei. Interacțiuni similare au loc constant între ciclul carbonului și cel al azotului.

*Influența omului* este foarte evidentă pe scară locală, unde poate perturba capacitatea proprie de echilibrare a unui ciclu, inducînd, uneori, modificări severe și greu reversibile ale mediului.

Ea se poate manifesta negativ și la scară globală, așa cum se întîmplă cu creșterea concentrației $CO_2$ în atmosferă, ca o consecință a industrializării și a arderii combustibililor fosili.

Poluarea, sub diferitele ei forme, cu un aport excesiv de materie și energie, frecvent asociat cu substanțe neobișnuite etc. poate modifica vi-

teza de transfer a elementelor între diferitele rezervoare, mărimea rezervoarelor, proporția formelor chimice utile, producînd schimbări majore în particularitățile biochimice al habitatelor și asupra comunităților de organisme care le populează.

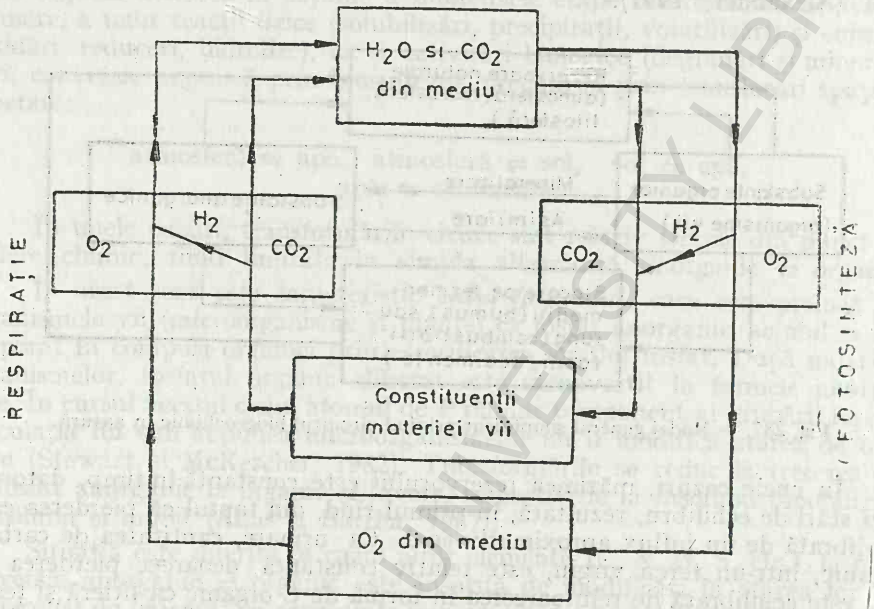



Fig. 288. — Interrelațiile dintre ciclurile oxigenului, al carbonului și al apei (după Weisz, 1971).

În circulația materiei în natură, rolul microorganismelor este esențial. Fără microorganisme n-ar putea exista plante, iar în lipsa lor, viața animalelor ar înceta. Prin urmare, microorganismele sînt tot atît de indispensabile vieții, ca și sursa de energie pe care o reprezintă soarele, deoarece fără unul dintre acești factori nu ar mai exista plante verzi, deci viața însăși ar înceta.

## CIRCUITUL BIOGEOCHIMIC AL AZOTULUI

**„Înainte de intervenția omului, procesele de fixare a azotului și de denitrificare erau echilibrate. Cu influențele antropogene crescute se pare că nu mai este cazul..."**

R. M. ATLAS
R. BARTHA

Azotul este un element esențial pentru existența vieții în biosferă, deoarece este inclus în structura tuturor proteinelor și a acizilor nucleici. Deși este prezent în natură în cantități foarte mari, se găsește, aproape invariabil, în forme inaccesibile plantelor și animalelor.

Azotul reprezintă, pe bază molară, 79% din conținutul atmosferei (adică $3,9 \times 10^9$ teragrame), sub formă de azot diatomic $N \equiv N$, gaz practic inert, inaccesibil sistemelor biologice. Se adaugă cantități importante prezente în structura plantelor și a animalelor terestre, în humus, în substanțele organice din organismele vii și din sedimentele din mări și oceanice, în roci etc. (tabelul nr. 64).

*Tabelul nr. 64*

**Distribuția azotului în principalele rezervoare în natură**
(după Delwiche, 1977)

| Compartimentul | Rezerva de azot (teragrame) |
|---|---|
| Atmosferă | $3,9 \times 10^9$ |
| Plante și animale | $1,0 \times 10^4$ |
| Sol (substanțe organice) | $1,7 \times 10^5$ |
| Sol (substanțe anorganice) | $1,6 \times 10^5$ |
| Mări (substanțe organice) | $8,9 \times 10^5$ |
| Mări (substanțe anorganice) | $9,9 \times 10^4$ |
| Sedimente | $2,0 \times 10^6$ |
| Roci vulcanice | $14 \times 10^{12}$ |

Este evident că deși aceste date au un caracter relativ, ele sînt suficient de sugestive pentru a ilustra amploarea rezervelor de N din mediile naturale. Diferențele dintre autori sînt, cel mai adesea, determinate de aprecierea diferită a compartimentelor respective (natură și limite). Spre exemplu, datele lui Delwiche (1970, 1977) referitoare la substanțele organice azotate din mare sînt raportate la cei 10 cm de strat „activ" de la fundul oceanului, în timp ce Söderlund și Svensson (1976) iau în considerație azotul organic dizolvat în coloana de apă.

În cadrul circuitului azotului în natură, azotul mineral ($NH_4^+$, $NO_3^{2-}$) este folosit de plante și înglobat în structura lor sub forma de constituenți celulari. Animalele sînt dependente de plante ca sursă majoră de N. Țesuturile vegetale și animale moarte sînt mineralizate prin procesul de proteoliză și *amonificare* și convertite prin *nitrificare* în forme din nou accesibile plantelor. Cu toate acestea, pierderile de azot din sol, legate de recoltarea plantelor de cultură, precum și cele adiționale determinate de *denitrificare* și levigație sînt atît de mari, încît cel puțin în cazurile solurilor agricole depășesc cantitatea de azot accesibil existent. Se apreciază că o producție de grîu de 5 000 kg/ha echivalează cu o pierdere de 120 kg N. În mod asemănător, o producție de 50 000 kg sfeclă de zahăr necesită 200 kg N, iar producerea de 5 000 kg biomasă uscată/ha/an pe o pajiște din regiunile temperate implică o pierdere de 150 kg N. Din aceasta decurge necesitatea îmbogățirii solului în azot combinat, fie pe cale naturală, prin fixarea biologică a azotului atmosferic, fie artificial, prin adăugare de îngrășăminte azotate. Altfel există riscul ca deficitul de azot să devină un factor limitant al producției primare în ecosistemele respective.

Cantitatea de azot fixat pe cale biologică este apreciată la 175 milioane tone N/an, din care $90 \times 10^6$ tone în solurile agricole.

Se adaugă azotul fixat pe cale abiotică prin iradieri, descărcări electrice din atmosferă (fulgere) apreciat la 10 tone N pe an și cel din procese de combustie, de la echipamente electrice, motoare cu combustie internă etc., ce produc oxizi de azot care eliberați în atmosferă sînt readuși de ploi în sol sub formă de nitrați. Volumul lor este apreciat ca fiind corespunzător la $15 \times 10^6$ tone N/an (Burns și Hardy, 1975; Belser, 1979).

Fixarea industrială asociată cu producerea de îngrășăminte azotate (aproape totdeauna după procedeul Haber) a fost aproximată la 40 milioane tone N/an la nivelul anilor '70.

Circulația biologică a azotului este un proces lent și continuu, prin care, sub acțiunea a peste 100 de genuri de bacterii diferite, azotul gazos atmosferic este convertit la forme fixe ($NH_4^+$, $NO_3^-$, $NO_2^-$), care sînt folosite de plante și introduse în forme organice, în constituenți structurali, utilizînd energia obținută prin fotosinteză. După moartea plantelor și a animalelor care i-au consumat, compușii organici ai azotului sînt mineralizați și restituiți rezervorului mare atmosferic în care timpul de rezidență este apreciat la $10^7$ ani (Garrels, Mackenzie și Hond, 1975).

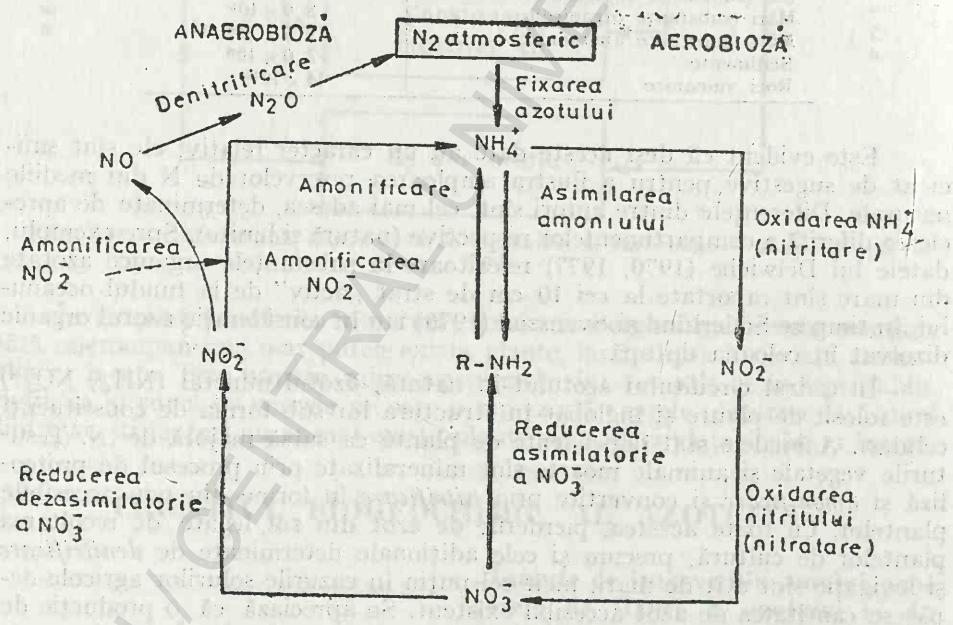



Fig. 289. — Reprezentarea schematică a circuitului biogeochimic al azotului, evidențiind etapele-cheie mediate de bacterii: R-$NH_2$ = grupările amino din proteinele celulare (după Atlas și Bartha, 1987).

Etapele critice esențiale ale acestui proces, implicînd intrarea în acțiune a mai multor activități biochimice, unele desfășurate în aerobioză, iar altele în anaerobioză sînt deci: 1) *fixarea azotului molecular*, 2) *amonificarea*; 3) *nitrificarea* (nitritarea și nitratarea) și 4) *denitrificarea* — toate mediate numai de bacterii, cu excepția unei etape premergătoare amonificării, proteoliza, în care pot acționa și microfungii (fig. 289).

În timp ce în ecosistemele naturale circulația azotului este un proces echilibrat, în sensul că pierderile de azot din sol sînt compensate de procesele de fixare, în sistemele supuse procesului de agricultură intensivă, pierderile depășesc ritmul de înlocuire. Se apreciază că 35% din populația globului este absolut dependentă de îngrășămintele azotate.

## FIXAREA BIOLOGICĂ A AZOTULUI

**„Fixarea biologică a azotului este factorul determinant major al productivității biologice a zonelor agricole cele mai avansate și a celor împădurite de pe Pămînt".**

J. R. POSTGATE
S. HILL

Fixarea biologică a azotului este realizată în exclusivitate de bacterii (tabelul nr. 65).

Nu există nici un exemplu de celule sau organisme eucariote fixatoare de azot molecular. Se apreciază că această proprietate a apărut în cursul evoluției într-o perioadă cînd speciile eucariote erau deja existente și bacteriile erau singurele organisme dotate cu capacitatea de a metaboliza anaerob și cu reductazele adecvate unei conversii în direcția nitrogenazelor (sistemul enzimatic esențial pentru fixarea azotului) (Ausubel, 1986) *.

### Bacteriile fixatoare de azot libere

Sînt reprezentate de două grupuri majore: 1) bacteriile chemotrofe și 2) bacteriile fototrofe (eubacterii și cianobacterii).

### Bacteriile chemotrofe fixatoare de azot

*Clostridium pasteurianum* (descoperit încă din anul 1893 de Winogradsky) și *Azotobacter* au fost descrise inițial ca singurele bacterii fixatoare de N și considerate mult timp ca avînd o importanță esențială pentru acest proces pe plan global.

Ulterior, s-a demonstrat că din numărul total de 260 de genuri de bacterii chemotrofe, aproximativ 10% conțin nitrogenază și, ca urmare, au proprietatea de fixare a $N_2$ atmosferic. Ele includ specii din genurile: *Alcaligenes, Aquaspirillum, Arthrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Beijerinckia, Campylobacter, Citrobacter, Clostridium, Derxia, Desulfotomaculum, Desulfovibrio, Enterobacter, Erwinia, Frankia, Klebsiella, Methylobacter, Methylococcus, Methylosinus, Mycobacterium, Propionibacterium, Rhizobium, Thiobacillus, Xanthobacter.* Dintre acestea, unele *(Rhizobium, Frankia, Azospirillum)* au capacitatea de a forma simbioze cu diferite grade de specificitate și activitate în natură. Celelalte sînt fixatoare de $N_2$ libere. Unele sînt aerobe *(Azotobacter, Beijerinckia* etc.), altele anaerobe *(Clostridium pasteurianum,*

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 226.

*Tabelul nr. 65*

**Principalele grupuri de microorganisme fixatoare de azot**

| Grupul sau familia | Genurile sau speciile principale | Caracteristici fiziologice |
|---|---|---|
| *Azotobacteriaccae* | *Azotobacter, Azomonas, Beijerinckia, Derxia, Xanthobacter* | Libere, heterotrofe, aerobe |
| *Spirillaceae* | *Azospirillum, Aquaspirillum, Campylobacter* | Libere, heterotrofe, microaerobe |
| *Methylomonadaceae* | *Methylosinus, Methylococcus, Methylomonas, Methylobacter* | Libere, heterotrofe, microaerobe |
| *Enterobacteriaceae* | *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter* | Libere, heterotrofe, facultativ anaerobe |
| *Bacillaceae* | *Clostridium* | Libere, heterotrofe, strict anaerobe |
| | *Thiobacillus* | Libere, autotrofe |
| *Chromatiaceae* | *Chromatium, Thiocystis, Thiocapsa, Ectothiospira* | Libere, fototrofe, anaerobe |
| *Chlorobiaceae* | *Chlorobium* | |
| *Rhodospirillaceae* | *Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium* | |
| *Cyanobacteria* | *Anabaena, Nostoc, Calothrix, Scytonema* | Fototrofe, aerobe cu heterochiști |
| | *Spirulina, Oscillatoria, Lyngbya, Plectonema, Phormidium* | Fototrofe, aerobe fără heterochiști |
| | *Synechococcus, Dermocarpa, Pleurocapsa, Xenococcus, Gloeothece* | Fototrofe, aerobe, unicelulare |
| *Rhizobiaceae* | *Rhizobium leguminosarum, R. trifolii, R. phaseoli, R. meliloti, R. lupini, Bradyrhizobium japonicum* | Simbiotice |
| *Streptomycetaceae* | *Frankia discariae, F. coriariae, F. dyadis, F. pushiae, F. casuarinae* | Simbiotice |

*Desulfovibrio, Desulfotomaculum)*, iar celelalte, în majoritate, aerobe facultativ anaerobe *(Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter)*.

Răspîndirea lor în natură este adesea caracteristică: *Azotobacter chroococcum* în soluri neutre și alcaline, *A. agilis* în ape uzate alcaline și neutre, sărace în N, bogate în carbon, *Beijerinckia* în soluri acide, în special tropicale și subtropicale, *Derxia gummosa*, în special în soluri din India.

BUCUREȘTI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Din mediile acvatice au fost izolate: *Azotobacter agile, A. chroococcum, Azomonas agilis, A. insignus*, precum și *Aeromonas* sp., *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Corynebacterium*, iar în Marea Neagră, o specie de *Spirillum* activ fixatoare de $N_2$.

Datele privind semnificația bacteriilor fixatoare de $N_2$ libere sînt foarte contradictorii.

Knowles (1965), lucrînd cu $^{15}N_2$, aprecia activitatea lor fixatoare la 0,1 kg — 73 kg N/ha/an, în condiții anaerobe și la 34,6 kg N/ha/an în aerobioză, în solurile din Québec.

Mulder, Lie și Woldendorp (1969) consideră că bacteriile fixatoare de $N_2$ libere au o contribuție minoră la economia globală a acestui element în natură și la fertilitatea solului, pe baza următoarelor argumente: 1) numărul celulelor de *Azotobacter* și *Beijerinckia*, în foarte multe soluri, este relativ mic. S-a demonstrat, în plus, că prezența în rizosferă a unui număr mare de bacterii fixatoare de $N_2$, ca *Azotobacter, Beijerinckia, Derxia* și *Azospirillum*, nu atestă rolul lor în economia azotului din sistemul respectiv; 2) stimularea fixării $N_2$ necesită consumul unor cantități mari de C organic; 3) în prezența compușilor cu N în mediu, îi utilizează preferențial pe aceștia, diminuîndu-și semnificativ capacitatea fixatoare; 4) în solurile fertile, activitatea lor este ușor depresată de microorganismele nefixatoare care consumă substraturile organice cu carbon; 5) majoritatea azotului fixat este utilizat pentru sinteza de material celular.

Day și colab. (1975), utilizînd tehnici mai riguroase, apreciază contribuția bacteriilor chemotrofe libere la 2—3 kg N/ha/an și cu un rol mai important în regiunile tropicale decît în cele temperate.

În ansamblu, în special pe baza studiilor de laborator efectuate cu tehnici moderne se consideră că rolul acestei categorii de microorganisme în fixarea $N_2$ și fertilitatea solului este incert. Ele explică lipsa de interes pentru bacteriile *Azotobacter, Beijerinckia, Clostridium* etc., atît de mult studiate pînă în anii '50.

Fixarea $N_2$ în mediile bine aerate este considerată unanim ca sporadică, dificilă sau imposibil de reprodus și are loc cu o rată insuficientă pentru a satisface nevoile recoltelor intensive. Importanța bacteriilor fixatoare de azot chemotrofe decurge, probabil, din capacitatea lor de a fixa cantități mici pe suprafețe mari și pe perioade îndelungate, în tot cursul anului și nu în perioade scurte (39—50 de zile) ca în cazul leguminoaselor.

### Bacteriile fototrofe fixatoare de azot

Din cele 12 genuri de bacterii fototrofe identificate pînă în prezent, 92% au capacități fixatoare de azot. Capacitatea de a sintetiza nitrogenaze este mai degrabă regula decît excepția la fototrofe (Stewart, 1983). Ele includ specii din genurile: *Amoebobacter, Chlorobium, Chromatium, Ectothiorhodospira, Pelodictyon, Prosthecochloris, Rhodomicrobium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Thiocapsa, Thiocystis.*

Datorită capacității de a face fotosinteză anoxigenică, importanța lor este limitată la mediile anoxice și anume, în principal, la sedimentele din lacurile puțin adînci.

### Fixarea biologică a azotului în asociație cu plantele

Foarte multe specii de bacterii fixatoare de azot sînt „asociate" în diferite grade cu plantele, în așa fel încît fixarea azotului este rezultatul unei cooperări mai mult sau mai puțin intime cu planta-gazdă (tabelul nr. 66).

În această categorie sînt cuprinse:

1) simbioza *Rhizobium*/plante leguminoase;
2) simbioza *Rhizobium*/plante neleguminoase;
3) simbiozele asociative;
4) simbiozele foliare;
5) actinorizele;
6) cianobacteriile fixatoare de $N_2$ simbiotice, care își exercită activitatea în asociații mai mult sau mai puțin eficiente cu diferite alte organisme, ca, de exemplu: a) cu fungii din categoria *Ascomycetes* sau *Basidiomycetes* în licheni; b) cu mușchii din grupul *Hepaticae (Anthochos, Blasia, Cavicularia)*; c) cu pteridofitele în asociația *Azolla/Anabaena azollae*; d) cu gimnospermele *(Cycas, Ceratozamia, Encephalartos* etc.); e) cu angiospermele *(Gunnera* sp.). Particularitățile diferitelor asociații simbiotice sînt prezentate în detaliu în cap. „Simbioza".

**Simbioza *Rhizobium* — plante leguminoase** reprezintă sistemul fixator cel mai eficient.

După Evans și Barber (1977), leguminoasele cultivate și cele din flora spontană introduc în sol $90 \times 10^6$ tone N/an, respectiv aproximativ jumătate din cantitatea totală de azot fixat pe cale biologică. Capacitatea fixatoare a sistemului *Rhizobium*/lucernă sau *Rhizobium*/lupin poate reprezenta între 350 și 600 kg N/ha/an.

Eficiența este determinată de caracterul integrat al simbiozei, în cursul căreia bacteriile beneficiază de glucidele sintetizate de plante în cursul fotosintezei, la rîndul lor, cedînd produșii rezultați din fixarea azotului, pe care îi exportă direct din nodul în organismul plantei pe calea unui sistem specializat.

Localizarea bacteriilor în nodozități le izolează de marile comunități de microorganisme din sol, cu care ar putea competiționa pentru nutrienți și energie și, în plus, creează condiții pentru protecția nitrogenazei de inactivare în prezența oxigenului. Leghemoglobina din nodozitățile plantelor leguminoase și, probabil, alte proteine similare din nodozitățile neleguminoaselor participă în transportul oxigenului, într-o concentrație extrem de mică, la bacteroizii fixatori de $N_2$. În plus, periferia nodozității acționează ca o barieră pentru difuzia $O_2$ liber, iar hidrogenaza asigură reciclarea hidrogenului produs în cursul fixării, în loc să fie pierdut.

Fixarea $N_2$ în *simbioza Rhizobium/plantele leguminoase* este limitată în timp la 30—50 de zile. Cu toate acestea, ea îmbogățește solul cu cantități de azot de cîteva sute de ori mai mari decît alte procese similare.

Este influențată de o serie de factori care țin de bacterii și de plante (eficiența tulpinilor de *Rhizobium*, capacitatea lor de a infecta, de a se multiplica, de a fi active în nodozități și de longevitatea acestora), precum și de o serie de factori externi (temperatură, pH, sol, gradul de iluminare a plantelor, aprovizionarea cu fosfor și microelemente, prezența N combinat în sol etc.).

*Tabelul nr. 66*

**Microorganisme fixatoare de azot în asociere cu plantele**

| Tipul asociației | Plantele | Bacteriile fixatoare de azot |
|---|---|---|
| Rizocenoze fixarea $N_2$ în rizosferă) | *Paspalum notatum*<br>*Saccharum officinarum*<br>*Spartina alternifolia*<br>*Zea mays*,<br>*Triticum aestivum*,<br>graminee furajere. | *Azotobacter paspali*<br>*Beijerinckia* sp.<br>*Campylobacter* sp.<br>*Azospirillum* sp. |
| Filocenoze (fixarea $N_2$ în filosferă) | *Eichornia crassipes*<br>*Larix* sp.<br>*Picea abies*<br>*Pinus sylvestris* | *Azotobacter chroococcum*<br>*Klebsiella* sp.<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Mycobacterium* sp. |
| Cianobacterii și fungi | Licheni | *Nostoc*, *Calothrix* etc. (ficobiont) + fungi (*Ascomycetes* sau *Basidiomycetes*) micobiont |
| Cianobacterii/*Hepaticae* | *Anthoceros*<br>*Blasia*<br>*Cavicularia* | *Nostoc* sp. |
| Cianobacterii/*Pteridophytae* | *Azolla* | *Anabaena azollae* |
| Cianobacterii/gimnosperme | *Ceratozamia*<br>*Encephalartos*<br>*Cycas* | *Nostoc* sp.<br>*Anabaena* sp. |
| Cianobacterii/angiosperme | *Gunnera*<br>(25 specii) | *Nostoc punctiforme*<br>(*N. gunnerae*) |
| *Rhizobium*/leguminoase | Grupul *Pisum* (*Vicia*, *Lathyrus*, *Lens*)<br>Grupul *Trifolium*<br>Grupul *Medicago* (*Melilotus*, *Trigonella*)<br>Grupul *Phaseolus*<br>Grupul *Lupinus-Vigna*, *Lotus*.<br>Grupul *Glycine* | *Rhizobium leguminosarum*<br>*R. trifolii*<br>*R. meliloti*<br>*R. phaseoli*<br>*R. lupini*<br>*Bradyrhizobium japonicum* |
| Actinorize (actinomicete/plante neleguminoase) | *Alnus glutinosa*<br>*Alnus rubra*<br>*Eleagnaceae* (*Eleagnus*, *Hippophäe rhamnoides*)<br>*Rhamnaceae*<br>(*Discaria*)<br>*Coriariaceae*<br>*Rosaceae*<br>(*Drias*)<br>*Purshia*<br>*Myricaceae*<br>*Casuarinaceae* | *Frankia alni*<br>*F. elaeagni*<br>*F. discariae*<br>*F. coriariae*<br>*F. dryadis*<br>*F. purshiae*<br>*F. brunchorsti*<br>*F. casuarinae* |
| Simbioze foliare | *Rubiaceae*<br>*Myrsinaceae*<br>*Dioscoraceae* | *Mycobacterium rubiacearum*<br>*Phylobacterium follicola*<br>*Klebsiella rubiacesrum* |

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deși răspîndirea diferitelor tipuri de bacterii în natură este practic ubicvitară, atît bacteriile libere, cît și diferitele asociații fixatoare de azot funcționează cu eficiență mai mare în anumite regiuni ale globului, în raport de condițiile de mediu (fig. 290).

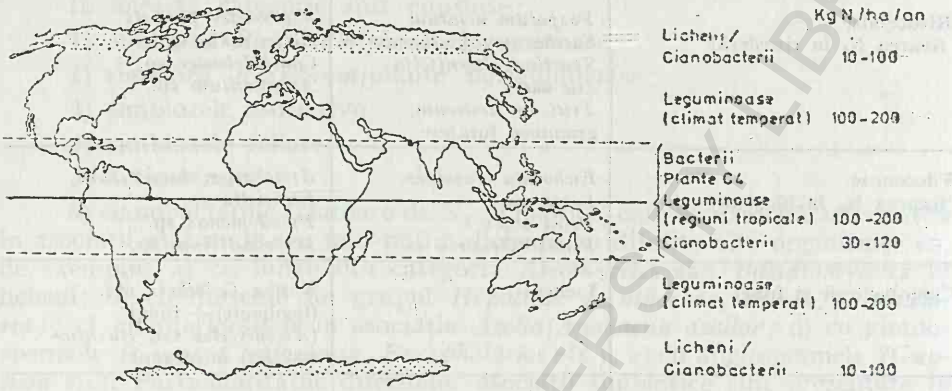



Fig. 290. — Semnificația cantitativă a diferitelor sisteme de fixare biologică a azotului, în diferitele regiuni ale globului unde au o importanță majoră (după Stewart, 1976, pe baza datelor Programului internațional de biologie).

## Fixarea azotului în filosferă
## Filocenozele

Filosfera — spațiul în contact cu suprafața frunzei și cu atmosfera, împrumutînd particularități proprii celor două medii atît de diferite — este populată de microorganisme ocazionale sau rezidente, care au frunza ca habitat natural. Ele includ bacterii pigmentate (protejate de către pigmenți carotenoizi de efectul nociv al radiațiilor), care produc substanțe mucoide ce favorizează aderența lor de suprafața frunzelor.

Speciile cele mai frecvent întîlnite sînt cele din genurile: *Klebsiella*, *Azotobacter* și *Beijerinckia*, cărora li se adaugă mai multe cianobacterii.

În general, fixarea $N_2$ este afectată de heterogenitatea caracteristică micromediului reprezentat de filosferă, cu variații mari în conținutul în apă (asigurat de ploaie și rouă) și în nutrienți. Apa de gutație, care conține cantități mari de aminoacizi, glucide și săruri minerale, favorizează multiplicarea lor și fixarea $N_2$ care sînt maxime în mediul umed.

Procesul este neglijabil în regiunile temperate, în care uscarea periodică a suprafeței foliare reprezintă un factor restrictiv major. Cantitatea de $N_2$ fixat de bacteriile din filosferă depășește nevoile proprii, în așa fel încît excedentul este cedat plantei-gazdă sau, în bună parte, este îndepărtat de ploaie; mecanismul prin care plantele ar putea folosi acest $N_2$ fixat este necunoscut. Oricum, procesul pare să nu afecteze semnificativ bilanțul azotului în natură (Mihăescu, 1989).

## Fixarea $N_2$ în mediile acvatice

Azotul este același element esențial pentru existența sistemelor biologice și în diferitele tipuri de medii acvatice. Producția primară de substanță

organică depinde în mare măsură de cantitățile de $NH_3$ și $NO_2^-$, în general mici (datorită condițiilor de oligotrofie), care pot acționa ca un factor limitant pentru dezvoltarea algelor și a microorganismelor fototrofe în general.

Microorganismele active includ, pe lîngă fixatorii aerobi liberi *(Azotobacter chroococcum*, foarte activ în hiponeuston, *A. agile, Azomonas insignis, A. agilis)*, bacterii facultativ anaerobe oligonitrofile *(Pseudomonas* sp., *Aeromonas sp., Achromobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Vibrio)*, bacterii anaerobe *(Clostridium pasteurianum* în sedimente), precum și bacterii fototrofe anaerobe *(Chromatiaceae, Chlorobiaceae* și *Rhodospirillaceae)*.

Cianobacteriile sînt rare în apele oligotrofe și frecvente în cele mezotrofe și eutrofe. Produc „înfloriri" în diferite perioade ale verii în regiunile temperate, după topirea ghețarilor în regiunile subarctice și în tot cursul anului la tropice.

Activitatea lor fixatoare de azot este corelată cu abundența celulelor specializate — *heterochiștii* — și este influențată de disponibilitatea de nutrienți — în special fosforul, a cărui lipsă în lacurile oligotrofe explică raritatea sau uneori chiar absența cianobacteriilor.

Activitatea fixatoare de $N_2$ este maximă la suprafața apelor, în jurul amiezei, cu variații determinate de perioada zilei, intensitatea luminii, tensiunea de $O_2$, capacitatea migrării pe verticală (datorită veziculelor cu gaze). În lacurile mezotrofe și eutrofe, bogate în materie organică, nivelul fixării $N_2$ este scăzut. După Postgate și Hill (1979), densitatea mică a cianobacteriilor în largul mării este din punct de vedere teoretic o anomalie, deoarece concentrația mică de azot și alcalinitatea sînt condiții favorabile pentru creștere. Este probabil că rolul determinant în limitarea multiplicării lor îl are oligotrofia.

În largul mării, singurul fixator de azot planctonic este cianobacteria filamentoasă *Trichodesmium*, care nu produce heterochiști. Ea se dezvoltă în regiunile tropicale sub forma unor „ghemuri". Fixarea azotului are loc în regiunea centrală a „ghemului", unde fotosinteza este blocată și nu se produce oxigen, care ar putea inactiva nitrogenaza.

Rinne și colab. (1977), citați de Rheinheimer (1985), apreciază cantitatea de $N_2$ fixat de *Aphanizomenon flos-aquae, Nodularia spumigena* și *Anabaena lemmermannii* în regiunile de nord și centrale ale Mării Baltice la 100 000 tone/an.

Figura 291 prezintă sintetic căile de circulație a azotului în mediile acvatice.

### Cianobacteriile fixatoare de azot atmosferic

Cianobacteriile sînt singurele microorganisme fixatoare de $N_2$, care fac fotosinteză de tip eucariot.

Ele au o răspîndire practic universală, fiind întîlnite atît în regiunile tropicale cît și în cele temperate și polare, în cele mai diferite medii: în apele dulci (în special mezotrofe și, mai ales, eutrofe), în apele marine, în lacurile sărate, în orice habitat umed neacid și cu competiție redusă cu microorganismele eucariote, în orezării, în solul pădurilor de foioase și de conifere, dar și pe pajiști, dune de nisip etc. Unele dintre ele se comportă ca microorganisme-pionier pe solurile minerale neroditoare lipsite de N.

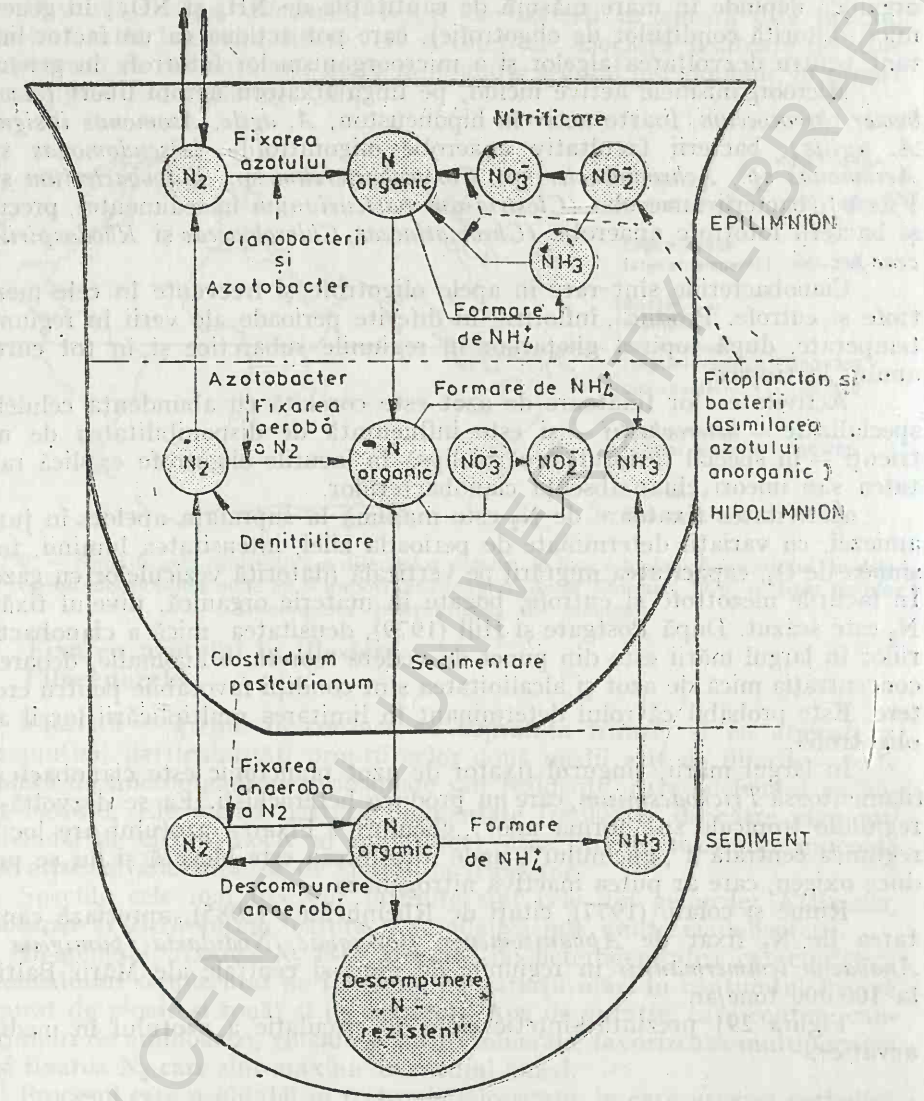



Fig. 291. — Reprezentarea schematică a proceselor determinate de microorganisme în circulația azotului într-un lac cu apă dulce (după Kuznetsov, 1959).

Pînă în prezent au fost identificate peste 30 de specii fixatoare de $N_2$, aparținînd genurilor: *Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Aulosira, Calothrix, Chlorogloea, Chlorogloeopsis, Chroococcidiopsis, Cylindrospermum, Dermocarpa, Fischerella, Gloeothece, Halosiphon, Lyngbya, Mastigocladus, Microcystis, Microchaete, Nodularia, Nostoc, Phormidium, Plectonema, Pleurocapsa, Pseudoanabaena, Rivularia, Scytonema, Spirulina, Synechococcus, Xenococcus.*

Cianobacteriile fixatoare de azot își pot exercita activitatea libere sau în asociații simbiotice cu diferite grade de eficiență.

*Cianobacteriile libere.* Cele mai multe specii fixatoare de $N_2$ prezintă structuri specifice — heterochiști — (dispuse terminal sau intercalar în filamentele de celule) lipsite de pigmenții accesorii ai fotosistemului II producător de oxigen. Heterochiștii au pereți celulari groși, care protejează nitrogenaza de efectul inactivant al oxigenului. Ei nu fac fotoliza apei și nici nu fixează $CO_2$, fiind celule diferențiate în scopul fixării $N_2$. Compușii cu C necesari reacțiilor energetice, inclusiv cei necesari pentru fixarea $N_2$ sînt importați din celulele vegetative învecinate ale filamentului care face fotosinteza (Pearl și Kellar, 1978)*.

Există și unele cianobacterii filamentoase lipsite de heterochiști, care fixează totuși $N_2$ (de exemplu, *Lyngbya, Oscillatoria, Plectonema, Pseudoanabaena, Spirulina* etc.). Ele diferențiază anumite celule din filament, în care reacțiile producătoare de oxigen ale fotosintezei sînt eliminate, pentru a fixa azotul, în timp ce fotosinteza este realizată în restul celulelor filamentului (Ausubel, 1986).

În general, cianobacteriile libere fixează $N_2$ în condiții de microaerobioză. Un alt mecanism protector este reprezentat de asocierea frecventă cu diferite bacterii heterotrofe localizate în teaca gelatinoasă care le înconjoară. Asocierea este benefică deoarece furnizează un mecanism reducător, al cărui rol benefic protector este evident mai ales în cursul zilei, cînd unele medii acvatice sînt suprasaturate cu $O_2$.

Importanța cianobacteriilor derivă și din faptul că rezistă și se multiplică în diferite condiții extreme (pe soluri vulcanice, atoli de corali, regiuni arctice și antarctice, izvoare termale).

În bazinele acvatice naturale, ele determină „înfloriri ale apelor" asociate cu o îmbogățire masivă în N fixat, mai ales în cazul dezvoltării excesive a diferitelor specii de *Anabaena*. Ulterior, cînd dezvoltarea cianobacteriilor intră în declin, are loc multiplicarea masivă a altor alge și apare o nouă „înflorire" în care predomină cloroficeele, euglenoficeele și peridineele (Gavrilă, 1978).

În mediul marin, cianobacteriile fixatoare de $N_2$ sînt reprezentate în special de *Anabaena variabilis, A. torulosa, Calothrix scopulorum, C. aeruginea, C. crustacea, Nostoc* sp., *Nodularia harveyana, N. spumigena, Rivularia atra, R. biasolettiana* etc. Ele sînt numeroase și active funcțional în mările din regiunile calde, unde periodic pot produce „înfloriri".

Rolul cianobacteriilor este greu de cuantificat, fapt reflectat și de datele furnizate de diferiți cercetători. După Jensen (1965), în orezării ar fi de 24 kg $N_2$/ha/zi, iar după datele lui Stewart (1977) ar fi maxim în regiunile tropicale (30—120 kg $N/ha^{-1}/an^{-1}$). Diferențele ar fi corelate cu condițiile climatice.

Cianobacteriile fixatoare de $N_2$ pot ameliora fertilitatea solurilor necultivate, în special din regiunile aride, formînd un strat dens de material algal pe suprafața acestora în cursul perioadelor ploioase. În perioadele de uscăciune, cele mai multe cianobacterii mor din cauza salinității crescute, a lipsei apei și a alcalinității excesive. Cele care supraviețuiesc reiau ciclul de multiplicare intensă, imediat după revenirea ploilor (Shields și Durrel, 1976).

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 235.

## PERSPECTIVELE ÎMBUNĂTĂȚIRII PROCESULUI DE FIXARE BIOLOGICĂ A AZOTULUI

**„Deși efectele negative ale fertilizatorilor cu N sînt abia la început și într-o fază localizată este evident că utilizarea lor necontrolată va duce la o catastrofă globală".**

J. R. POSTGATE
S. HILL

**„Ingineria genetică a simbiozei este un proces extrem de complex, care dacă este lăsat pe seama Naturii poate dura cîteva milioane de ani. Din fericire, omul este capabil să grăbească acest proces...".**

F. M. AUSUBEL

Marea importanță a fixării biologice a azotului pentru fertilitatea solului a determinat în ultimul deceniu unele demersuri privind ameliorarea activității bacteriilor fixatoare de N existente și obținerea unor noi microorganisme dotate cu această proprietate.

Această orientare este justificată și de faptul că fixarea industrială, în industria producătoare de îngrășăminte azotate, ridică numeroase probleme tehnice, economice și ecologice (procedeu energofag ce consumă 3% din producția mondială anuală de gaze naturale), precum și dificultăți ridicate de transport, aplicare, poluarea apelor freatice, a rîurilor și a lacurilor etc. Se apreciază că numai 50% din îngrășămintele administrate în sol sînt preluate eficient de către plante și că necesarul în anii 2000 este de 1 miliard tone/an. Lovvorn (1976) apreciază că pentru fiecare creștere de populație cu $6 \times 10^6$ locuitori, o țară trebuie să construiască o fabrică de îngrășăminte azotate (procedul Haber), cu o capacitate de $10^6$ kg $NH_4$/zi. Efortul este realizabil din punct de vedere tehnologic și financiar, dar consecințele negative pentru mediu sînt intolerabile: poluare, eutrofizare, contaminarea apelor freatice cu nitrați, acumularea de nitrozamine cancerigene, efect distructiv al stratului atmosferic cu ozon, prin acțiunea $N_2O$ produs în cursul denitrificării microbiene etc.

Printre procedeele preconizate pentru remedierea acestei situații, cele mai semnificative ca perspectivă de abordare sînt următoarele:

1) Mărirea activității fixatoare a tulpinilor de *Rhizobium*, în urma transferului genelor *hup* („*H*idrogen *up*take"), care asigură reciclarea eficientă a hidrogenului produs în nodozități *.

2) Transferul genelor *nif* la bacterii nefixatoare de $N_2$ în vederea obținerii de noi bacterii cu această proprietate. Realizarea este condiționată de numeroase dificultăți tehnice, decurgînd din necesitatea de a transfera 20—40 de gene, de a asigura stabilitatea și activitatea lor în noile celule,

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 232.

protecția nitrogenazei de acțiunea inhibitoare a oxigenului, aprovizionarea cu ATP (7 molecule de ATP pentru fiecare moleculă de azot convertită la $NH_4^+$) și NADH, reglarea sintezei diferiților produși codificați în cantități adecvate etc.

3) Obținerea de plante capabile să fixeze autonom azotul prin transferul genelor *nif*.

În afară de dificultățile legate de stabilitatea, exprimarea și reglarea genelor transferate, acest demers ridică probleme dificile legate de consumul de energie: plantele fixatoare de $N_2$ consumă mai mult fotosintat decît cele care folosesc azot combinat. La plantele de soia, 20% din fotosintat este consumat în nodul. Or, se apreciază că un consum similar la porumb ar determina o reducere semnificativă a producției, ceea ce ar face preferabilă, cel puțin în țările dezvoltate, administrarea de îngrășăminte azotate.

4) Mărirea spectrului de gazde în simbiozele asociative pentru a include toate plantele de cultură importante.

În general, toate aceste abordări au ca inconvenient major incompleta cunoaștere a bazelor genetice și biochimice ale fixării $N_2$ și a asociațiilor simbiotice. Este încă puțin cunoscută biologia bacteriilor fixatoare de $N_2$ în natură și contribuția lor la structura și funcția habitatului pe care îl ocupă, ecologia lor ca membri liberi ai rizosferei și ai microbiotei acesteia.

Există riscul ca bacteriile nou create sau plantele modificate să creeze dezechilibre în circulația altor elemente (P, K, Mg etc.), mai greu de normalizat, sau chiar de activare a unor microorganisme „sălbatice", capabile să competiționeze cu cele modificate genetic.

Interesul este stimulat de unele calcule care demonstrează că îmbunătățirile pe cale biologică ar fi echivalente cu aplicarea optimă de îngrășăminte azotate.

În ceea ce privește viitorul aplicării tehnicilor de inginerie genetică, Postgate (1979) consideră că „în 10—20 de ani fie că genele „fixatoare de azot" vor fi transferate cu succes la cereale, fie că vom cunoaște motivele științifice pentru care acest lucru nu va fi niciodată posibil". Termenul propus este aproape epuizat, iar progresele realizate sînt încă nesemnificative.

## MINERALIZAREA AZOTULUI ORGANIC DIN SOL

### AMONIFICAREA

Cea mai mare parte din azotul din orizonturile superficiale ale solului este prezent sub formă de N în combinații organice. El provine din proteinele vegetale sau animale, din biomasa microbiană, din excretele animale etc.

În climatul temperat, o rezervă majoră de N organic este asociată cu humusul. Și aceasta este accesibilă organismelor vii numai după ce a fost mineralizată printr-un proces foarte lent (Alexander, 1961). Extractele sau hidrolizatele de sol conțin, practic, toți aminoacizii existenți, legați în diferite combinații organice, și în cantități mici (2—400 ppb) ca aminoacizi liberi, glucide aminate (glucozamine, galactozamine etc.), baze nucleice purinice și pirimidinice etc. Aminoacizii legați reprezintă 20—50% din azotul total din humus, iar N din glucidele aminate 5—10%.

Mineralizarea N organic din sol este un proces esențial în ciclul acestui element în natură, deoarece asigură conversia la forme anorganice, mai mobile, utilizabile de plante, ca și de microorganisme.

În sens larg, procesul de amonificare evoluează în două etape succesive:

**Etapa nespecifică**

Etapa nespecifică, de proteoliză, este efectuată de microorganisme heterotrofe banale: *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus thermoproteolyticus*, *Proteus* sp., *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, sau de fungi ca: *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Alternaria* etc., cărora li se adaugă efectul proteinazelor de origine vegetală sau animală.

În cursul acestei faze, compușii organici cu structură complexă sînt hidrolizați la molecule care pot pătrunde în celule, fiind utilizate de alte microorganisme, sau sînt degradate în continuare în etapa specifică de amonificare propriu-zisă.

Enzimele implicate aparțin la două grupuri majore:

*Proteinazele* sînt endopeptidaze care atacă lanțul polipeptidic „în interior", clivîndu-l la peptide cu diferite mărimi. Unele proteinaze sînt nespecifice și scindează aleatoriu legăturile peptidice, iar altele sînt specifice, în sensul că recunosc numai anumite resturi de aminoacizi și hidrolizează legăturile peptidice din vecinătatea lor. Specificitatea are uneori caracter de grup (se manifestă față de aminoacizi bazici, aromatici etc.).

*Peptidazele* sînt exopeptidaze și acționează la capătul aminoterminal (aminoacid-peptidhidrolaze) sau hidrolizează peptidele la nivelul grupării terminale COOH (carboxipeptidaze).

Ambele tipuri de enzime eliberează di- sau tripeptide, care sub acțiunea di- sau tripeptidazelor eliberează aminoacizi liberi ce pot fi transportați intracelular.

După cum remarca Alexander (1971), în natură, acest proces interesează numai o mică fracțiune din rezerva de N organic care este, în general, persistentă datorită rezistenței la degradare. Două ipoteze, ce nu se exclud reciproc, pot explica această rezistență:

1) legarea proteinelor de constituenți neproteici ai humusului ca, de exemplu, complexele ligninoproteice, rezistente la degradare și

2) înglobarea proteinelor în rețeaua cristalină a argilelor minerale.

În plus, enzimele extracelulare, fiind ele însile proteine, sînt adsorbite pe diferiți compuși din sol și făcute mai puțin active. Experimental, prima cale este mai eficientă, dar nu este sigur că fenomenul se reproduce și în natură.

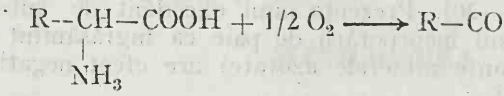
**Etapa specifică**

Această etapă, determinată de microorganismele din sol, asigură degradarea în continuare a compușilor rezultați din etapa premergătoare de proteoliză și a celor rezultați din hidroliza acizilor nucleici, precum și a ureei, acidului uric, glucidelor aminate etc. și conversia lor la $NH_3$.

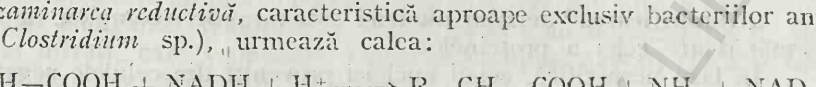
În sens strict, *amonificarea* este reprezentată de procesul de eliberare a $NH_3$, prin acțiunea microorganismelor asupra moleculelor rezultate din descompunerea proteinelor, a acizilor nucleici etc. În acest sens, producerea și eliberarea de $NH_3$ prin acțiunea microorganismelor de putrefacție nu este un proces de amonificare. Ea se realizează prin mecanisme diferite, încă incomplet elucidate, în funcție de natura microorganismelor implicate și de condițiile de mediu. Ele au însă, totdeauna, $NH_3$ ca produs final.

Au fost descrise mai multe căi metabolice de dezaminare, ca de exemplu:

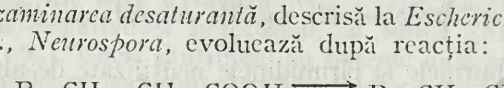
*Dezaminarea oxidativă*, descrisă la *Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* ș.a., evoluează după reacția:



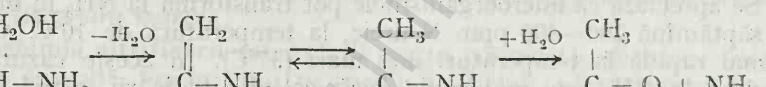
*Dezaminarea reductivă*, caracteristică aproape exclusiv bacteriilor anaerobe (*Clostridium* sp.), urmează calea:



*Dezaminarea desaturantă*, descrisă la *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Clostridium* sp., *Neurospora*, evoluează după reacția:



*Dezaminarea prin deshidratare*, descrisă la *Escherichia coli* și *Neurospora crassa*; urmează mai multe reacții cuplate:



$NH_3$ format, fiind volatil, este parțial eliberat în atmosferă, unde ar putea diminua riscul ploilor acide. Durata rezistenței în atmosferă este foarte scurtă (cîteva zile), timp în care $NH_3$ poate fi expus unor transformări fotochimice sau poate reacționa direct cu oxizii sulfului pentru a produce sulfat de amoniu. Aceștia pot reveni pe sol sau în mări și oceane odată cu ploile sau prin depuneri de particule. Cantitatea de N amoniacal prezent în precipitații — pe plan global — este apreciată la 38—85 milioane de tone/an.

O altă parte din $NH_3$ format este adsorbită temporar pe complexele argilo-humice sau, cea mai mare parte, convertit în condiții de aerobioză la $NH_4^+$, care este oxidat la nitriți și ulterior la nitrați, forma cea mai accesibilă plantelor și multor microorganisme.

Procesul de amonificare evoluează lent. Ritmul și randamentul său sînt evidențiate de cantitatea de N amoniacal care rămîne în sol la sfîrșitul procesului.

Amonificarea evoluează în condiții optime în straturile superficiale ale solurilor bine structurate, aerate, cu umiditate potrivită, la pH apropiat de neutralitate. Randamentul este optim la temperatura de 30°C, dar limitele la care se realizează sînt mult mai largi (2—40°C).

În solurile acide, viteza amonificării este redusă, dar randamentul este maxim, datorită capacității acestor soluri de a „fixa" $NH_3$ rezultat pe complexele argilo-humice.

În solurile foarte alcaline, randamentul este foarte mic deoarece $NH_3$ rămas liber este degajat.

Amonificarea este influențată și de raportul cantitativ dintre C și N în sol (normal C/N = 15—20). Prezența unui excedent de substanțe cu C (ca, de exemplu, în cazul încorporării de paie ca îngrășămînt „verde" fără asocierea unor substanțe minerale azotate) are efect negativ asupra randamentului amonificării.

**„Amonificarea" acizilor nucleici** este un proces complex, cu o evoluție asemănătoare celei a proteinelor.

În faza nespecifică, acizii nucleici proveniți din celulele vegetale, animale și din microorganisme sînt clivați la fragmentele mici și, final, la mononucleotide individuale. Degradarea este efectuată de ribonucleaze, dezoxiribonucleaze, nucleozidaze etc., sintetizate de bacterii din genurile: *Achromobacter, Bacillus, Clostridium, Streptomyces* sau de microfungi *(Aspergillus, Penicillium* etc.).

În etapa următoare, purinele și pirimidinele neutilizate de alte microorganisme sînt degradate de bacterii din genurile *Clostridium, Corynebacterium, Micrococcus, Pseudomonas* ș.a., pînă la stadiul de uree, care apoi suferă procesul normal de amonificare.

**Amonificarea ureei.** Ureea din sol provine din excreții, din metabolismul microorganismelor și din degradarea bazelor purinice și pirimidinice.

Se apreciază că microorganismele pot transforma la $NH_3$ în mai puțin de o săptămînă 200—400 ppm N ureic, la temperatura de 10°C. Conversia este mai rapidă la temperaturi mai mari (37°C). În aceste cazuri, ritmul conversiei la $NH_3$ este mai rapid decît cel al nitrificării, astfel încît $NH_3$ produs este pierdut prin volatilizare în atmosferă sau acumulat, după adsorbție prealabilă în sol.

Hidroliza ureei este realizată de un grup numeros de microorganisme capabile să producă enzima *ureaza*. Ele includ genurile: *Achromobacter, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Pseudomonas*, o serie de actinomicete și microfungi filamentoși. Lor li se adaugă grupul numit al urobacteriilor, caracterizate prin rezistență la concentrații mari de uree și la pH alcalin și prin capacitatea de a elibera cantități mari de $NH_3$.

Din grupul urobacteriilor fac parte o serie de bacterii — unele cu statut taxonomic discutabil — ca *Bacillus probatus, Urobacillus pasteurii, U. miquellii, Bacillus freudenreichii* și unii coci ca *Sarcina ureae, Micrococcus ureae, Planosarcina ureae* etc.

Conversia ureei la $NH_3$ decurge după reacțiile:

$$CO(NH_2)_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{urează}} (NH_4)_2CO_3$$

$$(NH_4)_2CO_3 \longrightarrow 2\,NH_3 + CO_2 + H_2O$$

(produs foarte labil)

Activitatea amonificatoare a urobacteriilor este foarte importantă, deoarece ureea conține 47% N, care altfel ar rămîne neutilizat de plante, iar cantitatea anuală de uree eliminată în natură este foarte mare, atingînd cîteva zeci de milioane de tone/an (se apreciază că populația umană a globului elimină în 24 de ore circa 15 mii tone N ureic, iar toate celelalte animale la un loc circa 1 500 mii tone).

Procesul de amonificare reprezintă o etapă indispensabilă a circulației N în natură. Prin el se realizează mineralizarea N organic și trecerea lui în formă amoniacală, utilizabilă ca atare sau după oxidarea la nitrați în nutriția minerală azotată a plantelor.

## NITRIFICAREA

Nitrificarea este un proces biologic prin care $NH_3$ sau alte forme reduse ale azotului anorganic, rezultate în cursul procesului de amonificare, sînt oxidate la nitrați, care reprezintă forma de compuși azotați cel mai ușor asimilabilă de către majoritatea plantelor.

Este realizată de bacterii specifice diferite, chemolitotrofe obligate, în două etape succesive strîns cuplate:

**Bacteriile care oxidează $NH_3$** (nitrit bacteriile sau nitrosobacteriile) sînt Gram-negative și heterogene ca formă (bastonașe, spiralate, sferice, lobulate etc.). Unele dintre ele au sisteme membranare complexe, intracelulare, vizibile pe secțiuni ultrafine la microscopul electronic.

Cele mai cunoscute sînt: *Nitrosomonas europea, Nitrosococcus nitrosus, N. oceanus, N. mobilis, Nitrosospira briensis, Nitrosolobus multiformis, Nitrosovibrio tenuis* (Backhoops și Harms, 1987).

**Bacteriile care oxidează nitriții** (nitrat bacteriile) sînt reprezentate de: *Nitrobacter winogradskyi, N. hamburgensis, Nitrococcus mobilis, Nitrospira gracilis, Nitrospira marina.*

**Biochimia nitrificării** este relativ puțin cunoscută, deoarece bacteriile active se dezvoltă foarte greu pe medii artificiale (durata unei generații 10 ore — cîteva zile).

Se admite, în general, că ele acționează după reacțiile generale:

1) $NH_4^+ + 1\ 1/2\ O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H_2O + 2\ H^+$ (Nitritarea)

2) $NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2\ H^+ + 2\ e^-$ (Nitratarea).

Deși nitriții apar constant în condiții de laborator ca produși intermediari ai procesului de nitrificare, existența lor în sol nu a fost evidențiată, ceea ce a permis inițial supoziția existenței în natură a unor microorganisme capabile să oxideze $NH_3$ direct la nitrați. De fapt, cele două grupuri de bacterii coexistă în strînsă asociere în sol, fapt care face ca nitriții rezultați din acțiunea bacteriilor care oxidează $NH_3$ să fie utilizați imediat de nitrat bacterii pe măsură ce sînt formați, chiar dacă sînt în cantități foarte mici. Această asociere funcțională exercită un rol protector pentru organismele din sol, deoarece acumularea de nitriți, care sînt toxici, le-ar fi dăunătoare.

**Prezența în natură.** Bacteriile nitrificatoare sînt prezente pretutindeni în sol, în bazinele acvatice, dulci și marine, în sistemele de epurare a apelor uzate, în depozitele de compost.

Densitatea maximă în sol este atinsă în straturile superioare (pînă la 10 cm), iar în bazinele acvatice la interfața dintre apă și sedimente, pe pereții tancurilor de aerare etc. În mări se găsesc, în special, în zona cuprinsă între 0 și 200 m, și la interfața apă — sediment.

Prezența oxigenului reprezintă exigența obligatorie pentru toate speciile de bacterii nitrificatoare. Reacțiile încetează imediat în absența lui sau se desfășoară într-un ritm încetinit pe măsură ce tensiunea $O_2$ scade.

Bacteriile nitrificatoare se dezvoltă cel mai bine la pH 7,5—8,0, dar cresc în natură și în condiții suboptimale (pH 6,0).

Temperatura optimă de dezvoltare este de 25—35°C, iar limitele sînt de 5° — 40°C.

În sol, umiditatea acționează indirect asupra nitrificării, datorită faptului că afectează gradul de aerare.

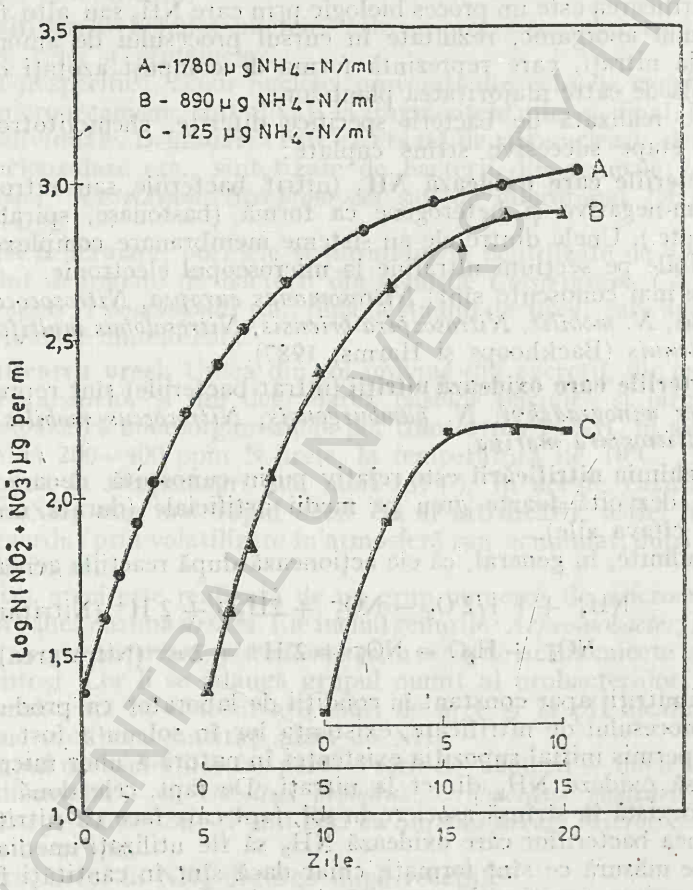



Fig. 292. — Viteza nitrificării la trei concentrații diferite de $NH_4$ (după Hofman și Lees, 1952).

În condiții normale, randamentul nitrificării este direct corelat cu cantitatea de $NH_4^+$ prezentă în mediu (fig. 292). Cantitatea de nitrați din sol, în general mică, reprezentînd în medie 2—20 mg/kg, poate atinge 60 mg/kg sol în cazul solurilor fertile, datorită activității bacteriilor nitrificatoare, care este maximă primăvara și vara. Transformînd $NH_4$ la $NO_2^-$ și $NO_3^-$, ele determină o schimbare de sarcină electrică de la pozitivă la negativă. Or, ionii încărcați pozitiv tind să fie legați de particulele de argilă încărcate negativ, în timp ce cei negativi migrează liber în apa din sol. În felul acesta, nitrificarea reprezintă un proces de mobilizare a N în habitatele terestre.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cele mai mari concentrații de nitrați se întîlnesc în orizonturile superficiale ale solului, unde, datorită prezenței $O_2$, activitatea microorganismelor nitrificatoare este optimă. Ținînd seama de acest fapt, procesul de nitrificare poate fi favorizat prin ameliorarea aerării solului cu ajutorul procedeelor agrotehnice, care asigură menținerea unei structuri permeabile pentru aer.

Nitrificarea reprezintă o etapă cu importanță excepțională în circulația N în natură, deoarece aduce substanțele azotate din mediu (sol, apă etc.) în forma lor cea mai ușor asimilabilă de către plante. De altfel, s-a observat că, în general, numărul bacteriilor nitrificatoare este corelat cu gradul de fertilitate a solului, el putînd ajunge în solurile foarte fertile pînă la un milion de bacterii/gram de sol. Este sigur că acest număr mare este determinat și de faptul că aceste soluri sînt lucrate și aerate.

Nitratul și nitrații pot fi ușor levigați, ajungînd în pînza de apă freatică.

Procesul are multiple *consecințe negative:*

1) Reprezintă o pierdere a formelor de N fixat din sol, cu consecințe negative asupra nutriției plantelor.

2) Nitritul reacționează cu compuși aminați din apa freatică, formînd nitrozamine cancerigene.

3) Nitratul netoxic *per se* poate fi redus la nitriți de către microorganismele din sistemul digestiv, determinînd fenomene toxice consecutive combinării lor cu hemoglobina.

Fenomenele de acest gen sînt, în principal, grave în regiunile în care îngrășămintele azotate au fost administrate în exces.

## DENITRIFICAREA

Descrisă inițial de Schonbein (1868), denitrificarea este un proces biologic efectuat în exclusivitate de bacterii și constă din reducerea dezasimilatorie a unuia sau a ambilor oxizi ionici ai azotului, nitratul ($NO_3^-$) și/sau nitritul ($NO_2^-$), la oxizi gazoși, ca oxidul nitric (NO) sau oxidul nitros ($N_2O$); aceștia pot fi ei înșiși reduși în continuare la N gazos și eliminați ca atare în atmosferă. Simultan, are loc oxidarea materiei organice din mediu cu producerea de energie.

Bacteriile denitrificatoare formează un grup biochimic și taxonomic heterogen, care reunește peste 75 de genuri diferite. Unele sînt autotrofe și se dezvoltă în prezența $CO_2$ și a H sau a compușilor reduși ai sulfului, iar cele mai multe heterotrofe. Contrar concepțiilor mai vechi, nici o bacterie denitrificatoare nu este strict anaerobă. Ceva mai mult, ele pot utiliza $O_2$ ca acceptor final de electroni și preferă chiar respirația aerobă, dacă aceasta este posibilă. Cresc în anaerobioză pe medii care conțin $NO_3^-$, $NO_2^-$ și $N_2O$.

Principalele bacterii denitrificatoare sînt: *Alcaligenes faecalis, A. eutrophus, A. denitrificans, Azospirillum* sp., *Bacillus azotoformans, Chromobacterium violaceum, C. lividum, Halobacterium marismortui, Hyphomicrobium vulgare, Moraxella* sp., *Neisseria sicca, N. flavescens, Paracoccus (Micrococcus) denitrificans, P. pentosaceum, Pseudomonas aerogenes, P. aureofaciens, P. denitrificans, P. stutzeri, Rhizobium* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Thiobacillus denitrificans* etc.

Sînt ubicvitare, fiind prezente în toate tipurile de sol, inclusiv în zona arctică și în Antarctica, în nămolul activat, în sedimentele lacurilor și în cele marine, și în număr mare în rizosfera plantelor, datorită prezenței substan-

țelor organice ușor accesibile. Este probabil că speciile de *Alcaligenes* și *Pseudomonas* ar avea un rol major în natură.

**Biochimia denitrificării** * este foarte complexă și pînă în prezent în parte neelucidată. Este un proces multienzimatic determinat de activitatea enzimelor nitrat reductaze, nitrit reductaze, oxidnitric reductaza și oxidnitros reductaza, care realizează secvența de reacții: $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$. Simultan cu denitrificarea are loc oxidarea substanțelor organice.

Reacțiile posibile sînt următoarele:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ KNO_3 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ KOH + 3\ N_2O$$

$$C_6H_{12}O_6 + 4\ NO_3^- \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 2\ N_2$$

$$5\ C_6H_{12}O_6 + 24\ KNO_3 \rightarrow 30\ CO_2 + 18\ H_2O + 24\ KOH + 12\ N_2$$

$$5\ S + 6\ KNO_3 + 2\ CaCO_3 \rightarrow 3\ K_2SO_4 + 2\ CaSO_4 + 2\ CO_2 + 3\ N_2$$

Procesul este mai activ în condiții de anaerobioză sau de tensiune redusă de $O_2$, în ape stagnante, în soluri umede sau inundate, în sedimentele acvatice, în rizosferă, în zona de hipolimnion a lacurilor eutrofice în cursul stratificării de vară și iarnă (mai intens decît primăvara și toamna) (Knowles, 1982).

*Alte forme de reducere a nitraților în natură*

Denitrificarea coexistă cu alte două forme lipsite de semnificație majoră pentru ciclul biogeochimic al azotului:

**Reducerea asimilatorie a nitraților**** este efectuată de un număr extrem de mare de bacterii, fungi filamentoși, levuri, alge și plante superioare. Are ca rezultat producerea de $NH_3$ care nu se poate acumula, deoarece este utilizat de celule pentru biosinteza de constituenți celulari. Figura 293 prezintă schematic deosebirea de reducerea dezasimilatorie (denitrificare) în cadrul ciclului azotului.

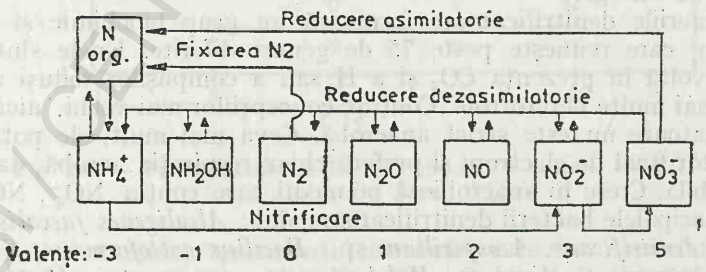



Fig. 293. — Rolul bacteriilor în circulația azotului în natură. Ca și alte organisme, bacteriile utilizează azotul în forme diferite, în funcție de natura lor. Unele fixează $N_2$ atmosferic, iar altele pot produce procese de dezasimilare, fie utilizînd forme oxidate ale N, fie oxidînd formele reduse ale acestuia (după Fenchel și Blackburn, 1987).

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 248.
** Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 245.

**Reducerea dezasimilatorie „incidentală"**, numită și respirație nitrat/nitrit, este un proces monoenzimatic, prin care cantități mari de nitrat sînt convertite la nitrit, care este eliminat ca atare, după reacția:

$$C_6H_{12}O_6 + 12\ NO_3^- \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 12\ NO_2^-,$$

sau care este uneori redus pe calea hidroxilaminei la $NH_3$ („amonificarea nitratului").

Nu produce compuși gazoși ai N și, ca atare, nu este un proces de denitrificare.

Poate fi efectuat de bacterii din genurile: *Aerobacter, Alcaligenes, Bacillus, Brucella, Clostridium, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Serratia, Staphylococcus* etc., în special în apele stagnante în stadiile de epurare a apelor uzate etc.

Este nesemnificativ pentru ciclul biogeochimic al N.

*Efectele negative* decurgînd din acumularea nitriților sînt oarecum limitate de toxicitatea acestora, care nu favorizează multiplicarea microorganismelor producătoare.

### Denitrificarea în sistemele terestre

Datorită complexității structurale, fizice și chimice a solului studiul denitrificării este greu de realizat. În mod obișnuit, gradul de denitrificare într-un anumit mediu este apreciat prin diferența dintre cantitatea de N total, prezent inițial sau adăugat, și cel care rămîne sau este pierdut. În general, cantitățile de $N_2$ eliberate sînt proporționale cu cantitatea de N total din mediu (Wijler și Delwiche, 1979) (fig. 294).

Solul se prezintă ca o matrice tridimensională de faze solide, lichide și gazoase, care primesc, periodic, apă și, deci, $O_2$ prin ploi, îngrășăminte cu N și C organic din resturile vegetale; aceasta determină, în ansamblu, o heterogenitate a condițiilor și o serie de gradienți de concentrație, uneori, la scală micrometrică, în care aprecierea activităților biochimice este greu de făcut. Alternanța de uscăciune și umiditate sau de îngheț și dezgheț determină variații spațiale și temporale, care pot stimula nitrificarea, urmată de denitrificare. De asemenea, administrarea îngrășămintelor de sinteză sau de resturi vegetale sau animale crează zone de mare concentrație de N anorganic sau respectiv de N și C organic.

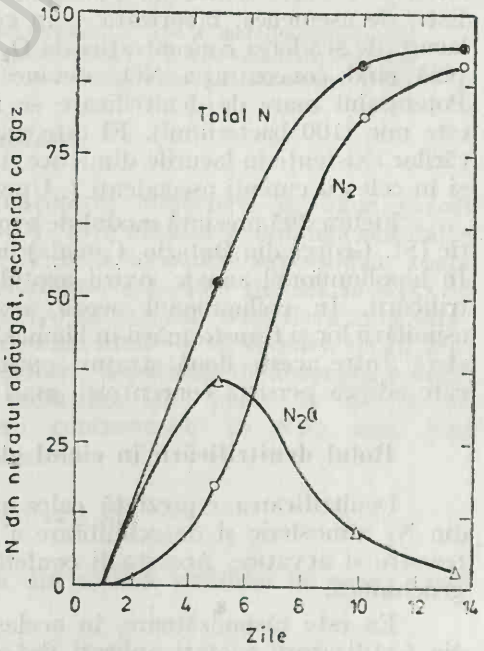



Fig. 294. — Eliberarea $N_2$ și $N_2O$ în solul cultivat cu lucernă, după adăugarea de nitrați și o sursă organică de carbon (resturi vegetale) (după Wijler și Delwiche, 1959).

Denitrificarea este, în mod particular, intensă în rizosferă, datorită exsudatelor și descuamării celulelor de pe suprafețele radiculare, secreției de mucigel polizaharidic etc. Se creează gradiente de concentrație a diferite substanțe, care formează o mare heterogenitate chimică ce stimulează dezvoltarea populațiilor de bacterii denitrificatoare. Ele sînt de 10—100 de ori mai numeroase în rizosfera plantulelor de stejar decît în solul necultivat. În rizosfera plantelor de orez, bacteriile denitrificatoare sînt de 514 ori mai numeroase decît în afara razei de acțiune a acesteia.

Dezvoltarea este maximă în rizoplan. Viteza eliberării $N_2$ din sol prin denitrificare este mărită de creșterea umidității dincolo de limita care împiedică accesul $O_2$, de alcalinitatea ușoară, de creșterea moderată a temperaturii, de consumul $O_2$ de către rădăcinile plantelor și microorganisme, de adăugarea masivă a îngrășămintelor azotate înainte de apariția vegetației (Stewart, 1970; Payne, 1973). Este redusă la minimum, paralel cu gradul de uscăciune, cu aerarea și cu aciditatea solului, cu agrotehnicile adecvate și, în special, în cazul adăugării treptate de îngrășăminte la intervale de timp în cursul perioadei de creștere activă a plantelor.

### Denitrificarea în sistemele acvatice

Datorită conținutului bogat în materie organică și anaerobiozei, sedimentele acvatice conțin $10^5$ — $10^{10}$ bacterii denitrificatoare/greutate de sediment uscat (în special *Acinetobacter, Acromonas, Bacillus* sp. și *Pseudomonas)* ceea ce indică un potențial ridicat de denitrificare (Jones, 1979). Este, de asemenea, favorizată și în coloana de apă atît în mare, cît și în lacuri de scăderea concentrației de $O_2$ la $\sim$ 0,2 mg/l$^{-1}$ așa cum se întîmplă pînă cînd concentrația $NO_3^-$ devine foarte scăzută (sub 10 $\mu$g $NO_3$/l$^{-1}$). Potențialul mare de denitrificare se realizează și cînd numărul bacteriilor este mic (100 bacterii/ml). El este maxim în hipolimnion, în cazul stratificărilor existente în lacurile dimictice, în lacurile anoxice acoperite de gheață și în cele cu curenți ascendenți („Upwelling") anoxici.

Figura 295 prezintă modul de evoluție a denitrificării într-un lac dimictic (St. George din Ontario, Canada) în care s-a realizat stratificarea estivală. În hipolimnionul anoxic, oxizii azotului au dispărut complet datorită denitrificării. În epilimnionul aerob, oxizii ionici de N au dispărut datorită asimilării lor și transformării în biomasă vie, iar $N_2O$ gazos a difuzat în atmosferă. Între aceste două straturi există un al treilea — metalimnionul — în care adesea persistă concentrații mari de $NO_3^-$, $NO_2^-$ și $N_2O$.

### Rolul denitrificării în ciclul global biogeochimic

Denitrificarea reprezintă calea majoră de formare a unei bune părți din $N_2$ atmosferic și de echilibrare a schimburilor dintre aceasta și mediile terestre și acvatice. Aceasta îi conferă o mare importanță ecologică și biogeochimică.

Ea este răspunzătoare, în același timp, de pierderi majore (5—80%) din fertilizatorii azotați aplicați de către om. De asemenea, reprezintă un mecanism ce favorizează reducerea conținutului în N al efluenților stațiilor de epurare a apelor reziduale, reducînd pericolele de eutrofizare a bazinelor receptoare.

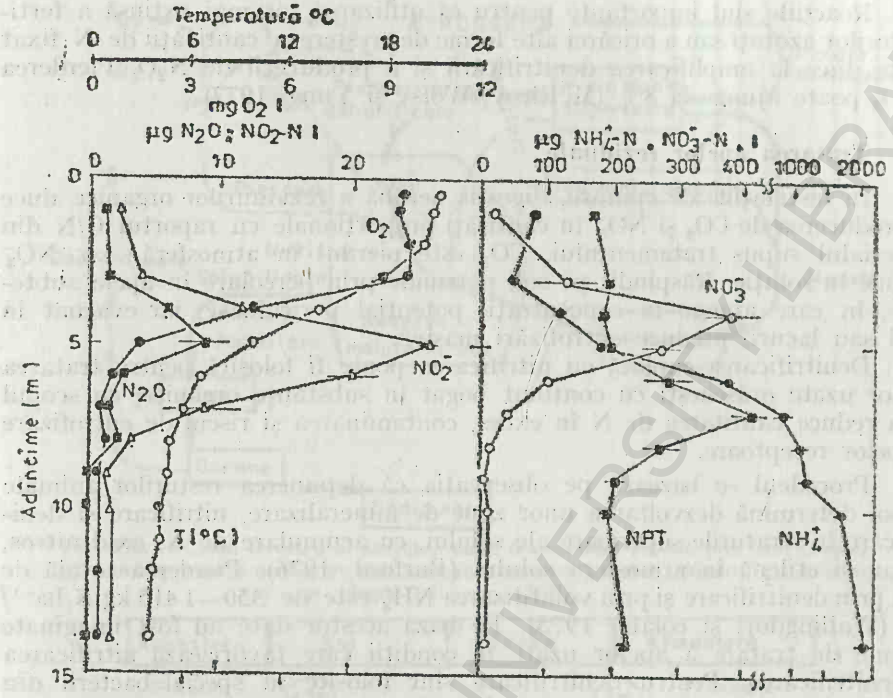



Fig. 295.—Reprezentarea grafică a producției oxizilor de azot în metalimnionul lacului Sf. George (Ontario). Datele reprezintă valori medii (± erorile standard) obținute în perioada iunie — septembrie: NPT = N particulat total (din Knowles, 1982).

## Influența asupra chimiei atmosferei

Denitrificarea poate îmbogăți conținutul atmosferei în oxizi gazoși ai N, ca oxidul nitric (NO) sau nitros ($N_2O$). Prin aceasta se adaugă celorlalte cauze (emisiunile de vapori și oxizi de N de la avioanele supersonice, reacțiile nucleare din stratosferă, difuziei clorofluormetanului (folosit în scop de refrigerare sau ca propulsor) și difuziei $N_2O$ în sus, din troposferă spre stratosferă), care modifică stratul normal de azot situat la altitudinea de 16 km. Acest strat cu rol protector esențial, datorită capacității de absorbție a componentelor potențial dăunătoare ale radiațiilor UV, poate fi alterat de produșii denitrificării, datorită creșterii concentrației de $N_2O$, care este expus unor reacții fotochimice în stratosferă:

$$N_2O + O(^1D) \rightarrow 2\,NO$$

Ulterior, $N_2O$ și NO participă la distrugerea stratului de ozon, după reacțiile:

$$NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$$

$$NO_2 + O \rightarrow NO + O_2$$

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Reacțiile sînt importante pentru că utilizarea tot mai extinsă a fertilizatorilor azotați sau a oricărei alte forme de creștere a cantității de N fixat poate duce la amplificarea denitrificării și a producerii de $N_2O$. Pierderea de $O_3$ poate ajunge la 8% (McElroy, Wofsy și Yung, 1977).

**Tratarea apelor reziduale**

În instalațiile de epurare, digestia aerobă a reziduurilor organice duce la producerea de $CO_2$ și $NO_3^-$ în cantități proporționale cu raportul C/N din materialul supus tratamentului. $CO_2$ este pierdut în atmosferă, iar $NO_3^-$ rămîne în soluție. Răspîndit pe sol, pătrunde prin percolare în apele subterane, în care ajunge în concentrații potențial periculoase, iar evacuat în rîuri sau lacuri, produce eutrofizări masive.

Denitrificarea cuplată cu nitrificarea poate fi folosită pentru tratarea apelor uzate orășenești cu conținut bogat în substanțe organice, cu scopul de a reduce cantitatea de N în exces, contaminarea și riscul de eutrofizare a apelor receptoare.

Procedeul se bazează pe observația că depunerea resturilor animale pe sol determină dezvoltarea unor zone de mineralizare, nitrificare și denitrificare în straturile superioare ale solului, cu acumulare de N, oxid nitros, metan și etilenă în atmosfera solului (Burford, 1976). Pierderea totală de azot prin denitrificare și prin volatilizarea $NH_3$ este de 350—1 415 kg $N/ha^{-1}$/an (Wallingdorf și colab., 1975). Pe baza acestor date au fost imaginate sisteme de tratare a apelor uzate în condiții care favorizează nitrificarea și denitrificarea. Pentru denitrificare sînt folosite în special bacterii din genurile: *Alcaligenes, Achromobacter, Bacillus, Pseudomonas* etc.

Există doar puține date privind efectul acestor instalații asupra concentrației $N_2O$ în atmosferă, deși fenomenul este foarte important.

Figura 296 sintetizează principalele etape ale circuitului global al azotului în natură, incluzînd fazele care implică rezervele din atmosferă, sol și mediul acvatic. Unii cercetători, între care Burns și Hardy (1975), au încercat să cuantifice (fig. 297) diferitele etape de conservare a compușilor azotului și viteza lor de transfer.

Concluzia generală este că în timp ce pe plan local (în mod particular la nivelul suprafețelor supuse unei agriculturi intensive) se pun probleme importante pentru evitarea unui deficit de azot, pe plan global, bilanțul circuitului azotului este pozitiv. Acest caracter este determinat de faptul că diferitele calcule estimative demonstrează că la nivelul biosferei cantitatea de azot fixat este mai mare decît cea pierdută prin recoltări, denitrificări, depuneri în sedimente. Astfel, Delwiche (1970, 1973) semnalează un fapt deosebit, care deși este raportat la perioada anilor '70, își păstrează întreaga semnificație. Cîștigul total de N fixat anual este de 92 milioane de tone, în timp ce pierderile prin denitrificare sînt limitate la 83 tone N/an. Diferența de 9 milioane de tone/an reprezintă, probabil, cantitatea de azot fixat, care este introdus anual în biosferă în structura a diferite molecule în sol, în lacuri, în rîuri, în oceane, precum și în rezervoarele subterane.

Datorită acestui aport crescut de N, mai ales în apele de suprafață și subterane există riscul ca această concentrație crescută de N să depășească nivelul acceptabil pentru consumul uman. Există riscul ca, în perspectivă, chiar pe plan global, să fie necesară utilizarea denitrificării pentru a

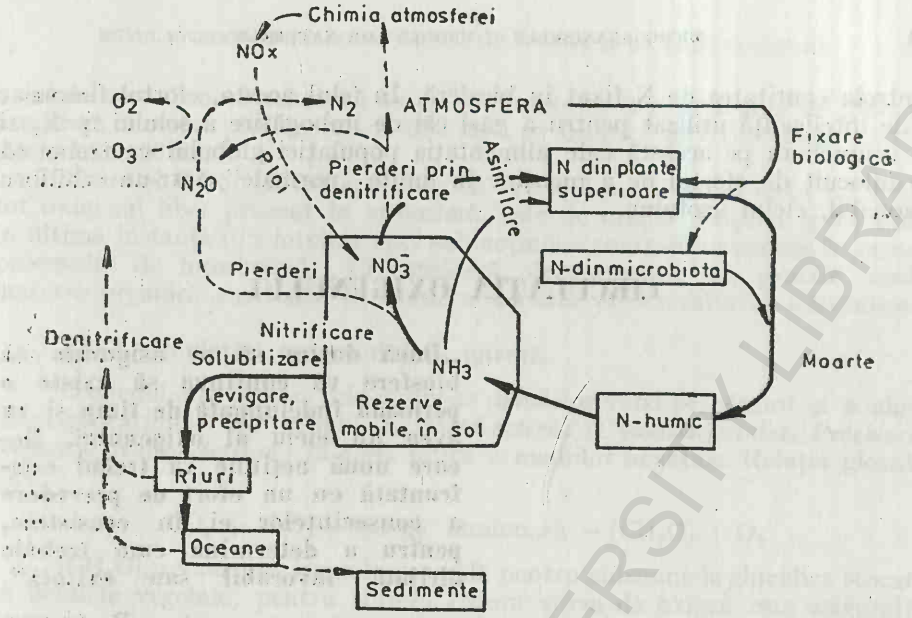



Fig. 296. — Ciclul terestru al azotului. Căile majore sînt trasate prin linii groase, cele cu importanță medie, cu linii normale continue, iar cele „minore" cu linii întrerupte (după Delwiche, 1977).

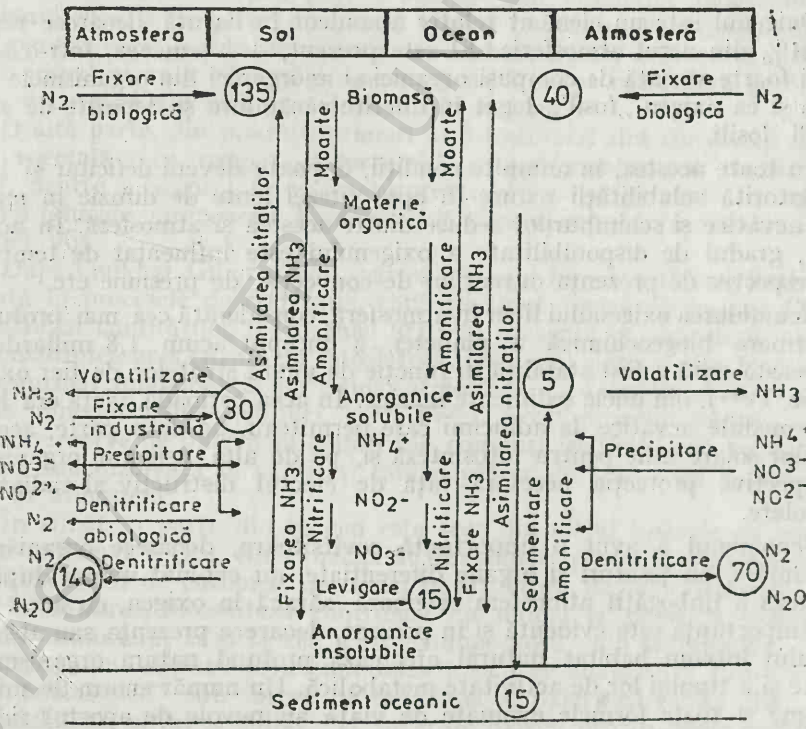



Fig. 297. — Schema generală a transferului azotului între atmosferă, mediile marine și cele terestre, indicînd interconversiunile dintre rezervoarele terestre și acvatice și cuantificarea transferului în milioane de tone metrice/an (după Burns și Hardy, 1975).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

controla cantitatea de N fixat în biosferă. În felul acesta, efortul financiar și de înțeligență utilizat pentru a găsi căi de îmbogățire a solului în $N_2$ și de a ameliora pe această cale alimentația populației globului va trebui să fie înlocuit de efortul de a menține în limite „normale", într-un echilibru rezonabil, ciclul azotului.

## CIRCULAȚIA OXIGENULUI

**„Dacă dorim să ne asigurăm că biosfera va continua să existe o perioadă îndelungată de timp și va avea un ciclu al oxigenului, fiecare nouă acțiune va trebui confruntată cu un efort de prevedere a consecințelor ei în ecosistem, pentru a determina cum trebuie dirijată favorabil sau evitată".**

P. CLOUD
A. GIBOR

Oxigenul este un element relativ abundent în natură, deoarece reprezintă 21% din aerul atmosferic. El este prezent, de asemenea, într-o serie largă și foarte variată de compuși organici și anorganici din organismele vii, precum și ca oxigen „fosil", legat în diferite zăcăminte și depozite de combustibili fosili.

Cu toate acestea, în anumite condiții, el poate deveni deficitar și limitant, datorită solubilității reduse în apă, vitezei lente de difuzie în marile bazine acvatice și schimburilor reduse dintre acestea și atmosferă. În aceste situații, gradul de disponibilitate a oxigenului este influențat de temperatură, respectiv de prezența curenților de convecție, de presiune etc.

Acumularea oxigenului liber în atmosferă, considerată cea mai profundă transformare biogeochimică a planetei, a început acum 1,8 miliarde de ani. Această dată a fost stabilită în funcție de vîrsta stratelor de fier oxidat (Fe feric, $Fe^{3+}$), din unele sedimente marine. În acea perioadă, viața era limitată în mediile acvatice, la adîncimi care permiteau, pe de o parte, accesul radiațiilor solare utile pentru fotosinteză și, pe de alta, asigurau organismelor respective protecția necesară față de efectul distructiv al radiațiilor ultraviolete.

Fenomenul a avut o importanță covîrșitoare, deoarece organismele multicelulare, cu țesuturi și organe diferențiate, au evoluat numai după ce fotosinteza a îmbogățit atmosfera originară, săracă în oxigen, cu acest element. Importanța este evidentă și în prezent, deoarece prezența sau absența oxigenului într-un habitat natural afectează profund natura organismelor prezente și a tipului lor de activitate metabolică. Un număr enorm de microorganisme și toate formele evoluate de viață au nevoie de aportul ridicat de energie caracteristic metabolismului oxidativ, în timp ce numai un număr limitat de organisme se pot dezvolta în anaerobioză (efectuînd procese fermentative în absența oxigenului). Semnificative în acest sens sînt datele experi-

mentale care demonstrează că oxidarea în aerobioză a unui mol de glucoză are drept rezultat producerea de 686 kcal, în timp ce în fermentație se produc numai 50 kcal.

Cloud și Gibor (1970) apreciază că cea mai mare parte, dacă nu chiar tot oxigenul liber prezent în atmosferă, este de origine biogenă (provenind în ultimă instanță din fotoliza apei sub acțiunea energiei luminoase în cursul procesului de fotosinteză). Ei consideră, de asemenea, că, practic, toată materia organică existentă în biosfera actuală este rezultatul fotosintezei.

### Căile circulației oxigenului în natură

Oxigenul este produs prin acțiunea plantelor verzi pe pămînt și a algelor și procariotelor din grupul *Oxyphotobacteria (Cyanobacteriales, Prochlorophytes* și *Halobacterium)* în zona fotică a mediilor acvatice. Relația globală este:

$$CO_2 + H_2O + \text{energie luminoasă} \rightarrow [CH_2O] + O_2$$

$[CH_2O]_n$ reprezintă formula generală pentru substanțele glucidice stocate în celulele vegetale, pentru sinteza cărora sursa de oxigen este asigurată, după cum s-a demonstrat fără echivoc, de $CO_2$.

O parte din oxigenul eliberat în atmosferă este convertit sub acțiunea radiațiilor ionizante la ozon ($O_3$) și sustras din circulația biogeochimică. El asigură funcția de ecran protector, oprind radiațiile ultraviolete dăunătoare pentru organismele vii. Cantitatea redusă de $O_3$ face ca diminuarea sa sub impulsul unor activități umane să aibă drept consecință perturbări grave, decurgînd din afectarea funcției de ecranare.

O altă parte, din produșii primari ai fotosintezei sînt convertiți în biomasă vegetală — ca oxigen „structural" — după combinarea cu alte elemente, pentru a asigura formarea tuturor moleculelor prezente în organismele vii (glucide, aminoacizi, lipide etc.) (Oxigenul reprezintă 1/4 din atomii materiei vii).

După Could și Gibor (1970), partea cea mai importantă cantitativ este utilizată în procesele de respirație, care, pe lîngă faptul că produc $CO_2$ ce este adăugat cantităților foarte mici (0,03%) prezente în atmosferă, asigură și reconstituirea apei clivată în fotosinteză. Oxigenul derivat din fotosinteză a transformat fundamental nu numai atmosfera, ci a oxidat și mari cantități de minerale reduse (sulfuri, $Fe^{3+}$, $Fe^{2+}$). Acest proces a permis formarea unor rezerve de oxigen în sulfați sau compuși cu $Fe^{3+}$, sub formă sedimentară sau dizolvată în cantități care depășesc de cîteva ori pe cele prezente în atmosferă.

În sfîrșit, o parte din oxigen este scos din ciclul biologic ca parte a ionului carbonat ($CO_3^-$), fiind precipitat din soluție și stocat prin consolidarea sedimentelor de carbonat de calciu în structura rocilor calcaroase. Prin aceste mecanisme, fotosinteza contribuie nu numai la prezența oxigenului liber din atmosferă, ci și la cea a oxigenului „fosil" din sedimente.

Oxigenului obținut prin biofotoliza apei i se adaugă cel provenit din surse „nebiologice" sub formă de $CO_2$, apă și oxizi anorganici (fig. 298). În special ionii nitrat și sulfat sînt surse de oxigen pentru unele organisme vii, care îi reduc la $NH_3$ și respectiv la $H_2S$, care apoi sînt reoxidați, circulînd în biosferă. Printre rezervele cele mai activ circulate sînt cele de oxigen atmosferic și dizolvat, $CO_2$ și apă.

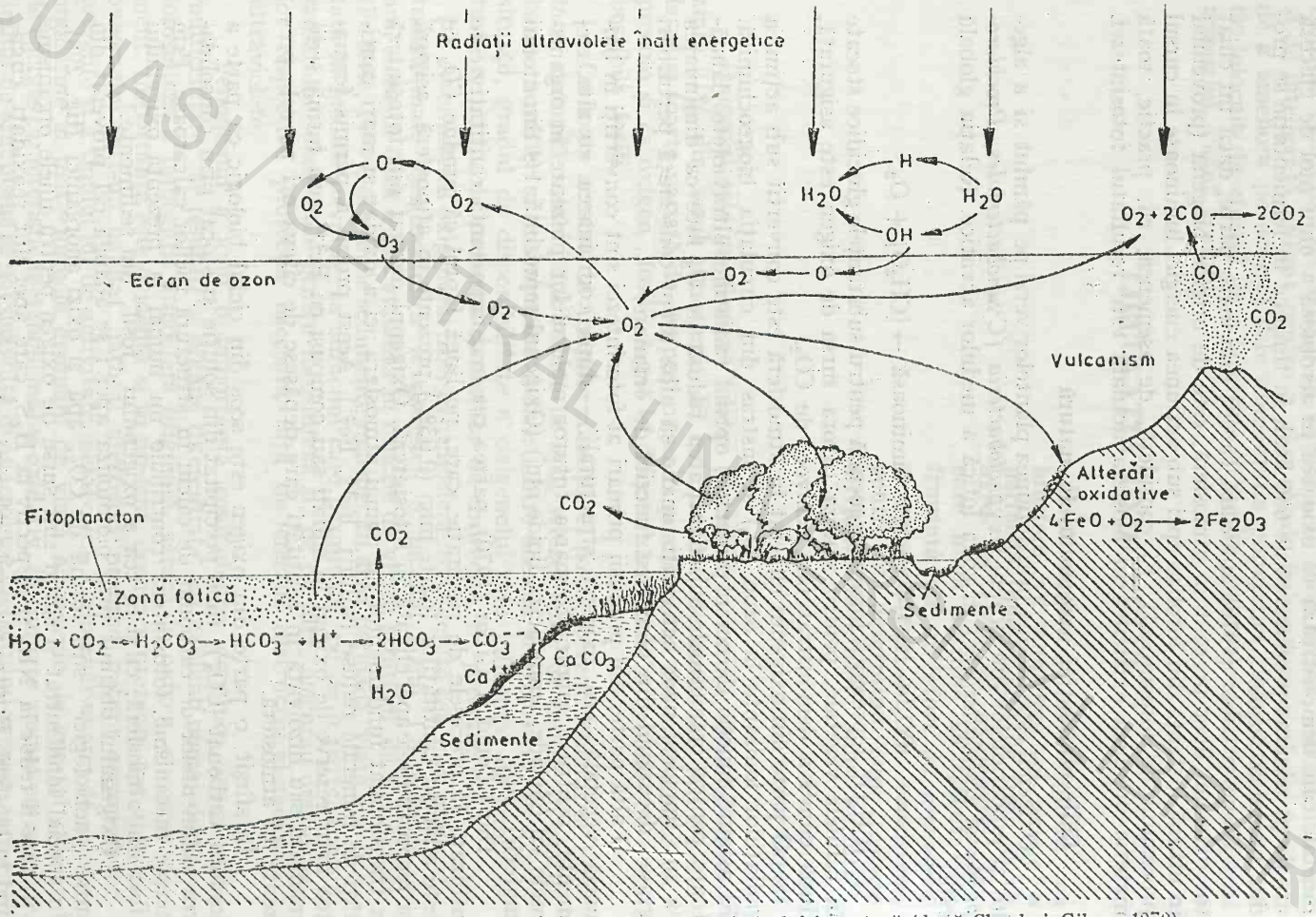



Fig. 298. — Reprezentarea schematică a ciclului global al oxigenului în natură (după Cloud și Gibor, 1970).

Rezervele de oxigen din materia organică vie sau neanimată, ca și cele prezente (în cantități foarte mari) în compuși minerali (inclusiv în carbonați) sînt recirculate cu o viteză foarte redusă. Activitățile umane influențează evoluția ciclului oxigenului în biosferă în afara schimburilor respiratorii prin combustia cărbunilor, a petrolului și a gazelor, care măresc conținutul atmosferei în $CO_2$. Se consideră că aceste activități nu ar afecta în mod evident bilanțul general al oxigenului în natură și că, teoretic, arderea tuturor rezervelor cunoscute de combustibili fosili ar reduce rezerva de $O_2$ (21%) doar cu 3% (Atlas și Bartha, 1987). Cu toate acestea, modificările determinate în anumite habitate prin alterarea echilibrului cu atmosfera, descompunerea rapidă a materiei organice și alte fenomene, care duc la dispariția oxigenului molecular ca acceptor de electroni, afectează profund structura și activitățile comunităților de microorganisme. Revenirea la normal este un proces relativ dificil, datorită, în principal, capacității reduse de difuzie a oxigenului.

## Rolul microorganismelor în circulația oxigenului în natură

Acesta este mai evident în mediile acvatice, în care concentrația oxigenului și relațiile sale cu viața aerobă sau anaerobă sînt mai ușor de urmărit. În general, în apele repede curgătoare sau cu un grad mare de turbulență, masa de apă este bine amestecată și, în consecință, o bună parte din oxigen este transferat pînă în straturile profunde. O situație similară se observă în largul mărilor, care sînt mai rar deficitare în oxigen datorită curenților oceanici. Fac excepție apele marine din golfuri, fiorduri sau unele mări interioare (ca, de exemplu, Marea Neagră).

Un caz particular, studiat încă din anul 1911, de Birge și Juday, este cel al unor bazine acvatice din regiunile temperate în care vara are loc un proces de stratificare, determinat de temperatură. Apele mai calde și mai puțin dense de la suprafață sînt separate de straturile profunde situate sub termoclină (mai reci și mai dense). După stabilirea stratificării la începuturile verii, straturile profunde devin anaerobe. Materia organică neconsumată în regiunile superioare cade la fund, unde este folosită ca hrană de microorganismele facultativ aerobe, care utilizează oxigenul dizolvat în apă în metabolismul lor, ca acceptor final de electroni. Ele reduc și mai mult conținutul în oxigen al apelor profunde, în așa fel încît adîncul acestora, ca și sedimentele sînt populate aproape exclusiv de microorganisme obligat anaerobe (care nu tolerează concentrații de oxigen mai mari de 1% din cele atmosferice) și numai uneori de microorganisme microaerofile. Toamna tîrziu și la începutul iernii se realizează o „răsturnare" a straturilor de apă, care determină reaerarea celor adînci: apele de suprafață devin mai reci și mai grele decît cele profunde și asigură omogenizarea condițiilor pe întreaga coloană de apă.

Datorită acestor fenomene unele lacuri din regiunile temperate prezintă un ciclu anual de trecere alternativă sezonieră a apelor profunde de la aerobioză la anaerobioză și invers.

Modificări semnificative în concentrația oxigenului, corelate cu dezvoltarea microorganismelor sînt semnalate de Brock (1974) în rîurile în care sînt deversate mari cantități de substanțe organice sub formă de ape uzate sau de poluare industrială. Cantitatea mare de substanță organică determină o creștere excesivă a bacteriilor heterotrofe și un deficit de oxigen, deși

scurgerea poate fi rapidă și agitația apelor intensă. În aval apar modificări semnificative ca, de exemplu: pe măsură ce apa se îndepărtează de sursa de contaminare, materia organică este consumată treptat, conținutul în oxigen revine la normal, $NH_4^+$, crescut inițial, este utilizat de bacterii nitrificatoare și convertit la $NO_3^-$. Nutrienții anorganici proveniți din degradarea substanțelor organice fac posibilă creșterea algelor, iar numărul bacteriilor scade progresiv, fiind consumate de protozoare.

Cu tot caracterul relativ al acestui gen de estimări, amploarea deosebită a schimburilor ce intervin în circulația oxigenului în natură este sugerată de unele date, furnizate de Rubey, citat de Cloud și Gibor (1970). Astfel, cantitatea de oxigen total este apreciată la $590 \times 10^{20}$ g, din care $39 \times 10^{20}$ g ar fi prezente în atmosferă, în compoziția sulfaților din unele ape saline și în alte surse minore, iar restul de $551 \times 10^{20}$ g în roci calcaroase, materia organică din unele roci sedimentare, în sulfații din sedimente și în oxidarea FeO la $Fe_2O_3$.

Se apreciază că cele 1,5 miliarde de $km^3$ de apă prezente pe Terra pot fi clivate prin fotosinteză și reconstituite de organisme la fiecare două milioane de ani.

$CO_2$ respirat de celule are șansa de a fi utilizat din nou de celulele vegetale după o durată medie de rezidență în atmosferă de aproximativ 300 de ani.

În sfîrșit, oxigenul generat prin fotosinteză ar intra temporar în atmosferă și ar fi reciclat la fiecare 2000 de ani.

În bazinele acvatice, ciclul oxigenului este strîns interconectat cu cel al carbonului, microorganismele fotosintetizante și, în special, bacteriile heterotrofe, determinînd profilul biologic și productivitatea acestora (fig. 288).

## CIRCULAȚIA CARBONULUI ÎN NATURĂ

**„Istoria circulației carbonului în natură ne învață că omul nu poate controla echilibrele globale. De aceea, este mai bine să le lăsăm aproape de starea lor naturală, care a existat înainte de începutul revoluției industriale. Realizarea acestei exigențe ar putea deschide calea unei noi revoluții industriale".**

B. Bolin

Carbonul, element biogen esențial pentru existența sistemelor biologice, este prezent în natură în diferite combinații, anorganice sau organice, repartizate în rezervoare cu circulație rapidă, precum și stocat în forme care circulă foarte lent sau deloc (fig. 299).

Forma cea mai expusă circulației rapide este $CO_2$ atmosferic, care reprezintă 0,032% (320 ppm) și care este echivalent cu o cantitate globală de 700 miliarde tone C. În apa de mare, C anorganic este prezent în soluție,

sub formă de $CO_2$, $H_2CO_3$, $HCO_3^-$ și $CO_3^{2-}$ sau precipitat sub formă de carbonați insolubili.

Cele două ecosisteme majore, atmosfera și hidro-ecosfera, sînt strîns cuplate în așa fel încît asigură un schimb echilibrat de $CO_2$. Se apreciază că în fiecare an, 100 miliarde tone de $CO_2$ atmosferic sînt dizolvate în mare și o cantitate relativ echivalentă de $CO_2$ oceanic este transferată în atmosferă. În felul acesta, cantitatea de $CO_2$ dizolvat în straturile superioare ale oceanelor este în strîns echilibru cu concentrația $O_2$ în atmosferă ca întreg. Schimbul este favorizat de acțiunea vîntului și a valurilor, de consumul

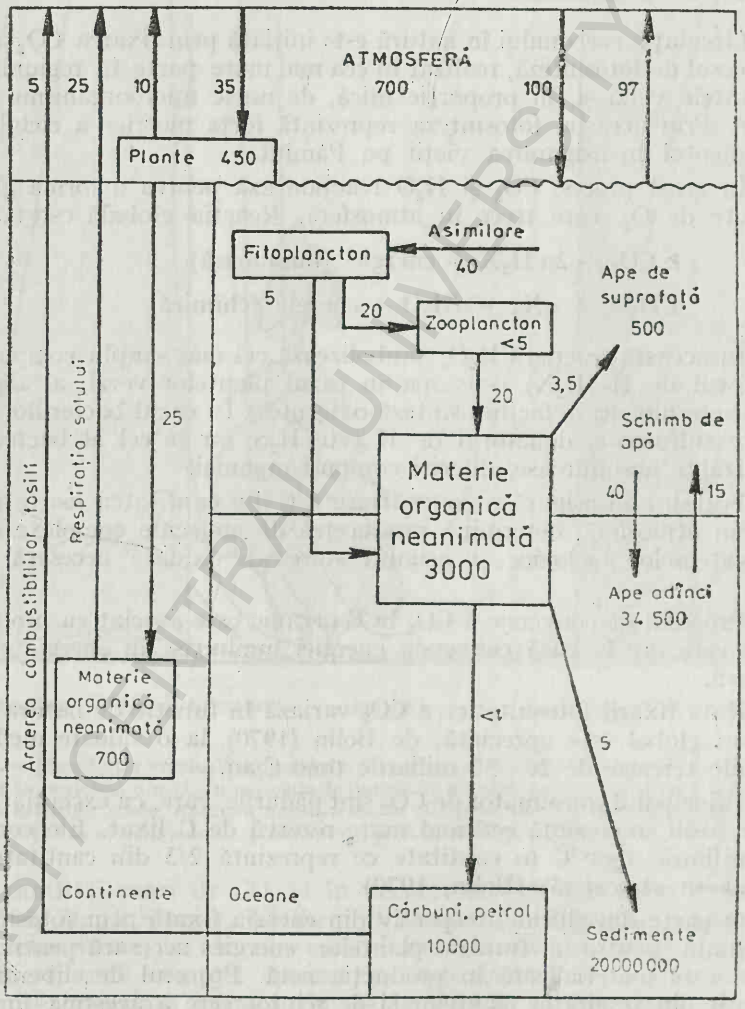



Fig. 299.—Reprezentare schematică a circulației carbonului în biosferă. Cele două cicluri distincte, corespunzînd regiunilor terestre și marine, sînt interconectate la interfața ocean—atmosferă. Estimările cantitative sînt prezentate în miliarde de tone metrice (după datele lui Bolin, 1970 Fontan și Servant, 1973).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$O_2$ de către animalele marine și de eliberarea de $CO_2$ prin respirație și prin mineralizarea substanțelor organice după moartea organismelor marine.

Un echilibru asemănător caracterizează schimburile dintre litosferă și atmosferă: cantitatea de $CO_2$ atmosferic fixată prin fotosinteză este compensată prin eliberarea de $CO_2$ provenit din descompunerea substanțelor organice, prin mineralizare. Datorită acestor condiții — exceptînd intervenția unor factori perturbatori cum sînt cei de origine antropogenă — concentrația $CO_2$ atmosferic nu este expusă unor variații semnificative.

### Rolul fotosintezei

Circulația carbonului în natură este inițiată prin fixarea $CO_2$ atmosferic în procesul de fotosinteză, realizat în cea mai mare parte în regiunile terestre de plantele verzi și, în proporție mică, de unele microorganisme fotosintetizante. Prin aceasta, fotosinteza reprezintă forța motrice a ciclului, cu rol fundamental în asigurarea vieții pe Pămînt.

În acest proces, $CO_2$ și $H_2O$ reacționează pentru a forma glucide, cu eliberare de $O_2$, care trece în atmosferă. Reacția globală este:

$$n\,CO_2 + 2n\,H_2X + \text{energie (luminoasă)}$$

$$CH_2O_n + nX_2 + nH_2O + \text{energie (chimică)}$$

În această reacție, $CH_2O_n$ simbolizează cel mai simplu compus organic. Donatorul de H ($H_2X$) este apa în cazul plantelor verzi, al algelor și al cianobacteriilor (care fac fotosinteză oxigenică). În cazul bacteriilor fotosintetizante sulfuroase, donatorul de H este $H_2S$, iar în cel al bacteriilor fotosintetizante nesulfuroase, diferiți compuși organici.

Fotosinteza asigură o concentrare a C din cantitatea foarte mică existentă în atmosferă, determină producerea de molecule complexe caracteristice sistemelor biologice și asigură starea de oxidare necesară existenței vieții.

Procesul de conversie a $CO_2$ la C organic este asociat cu producția primară, care are la bază conversia energiei luminoase în energie chimică de legătură.

Rata fixării fotosintetice a $CO_2$ variază în funcție de natura plantelor. Pe plan global este apreciată, de Bolin (1970), la o valoare medie pentru regiunile terestre de 20—30 miliarde tone C/an.

Principalul consumator de $CO_2$ sînt pădurile, care, cu excepția combustibililor fosili, reprezintă cea mai mare rezervă de C fixat. Ele conțin 400—500 miliarde tone C (o cantitate ce reprezintă 2/3 din cantitatea de $CO_2$ prezent în atmosferă) (Bolin, 1970).

O parte din glucide, respectiv din energia fixată prin fotosinteză, este consumată pentru a furniza plantelor energie necesară pentru creștere. Restul este materializată în producția netă. Procesul de eliberare de $CO_2$ provenit din respirația plantelor și de reîntoarcere a acestuia în atmosferă este continuu. Ritmul lui este variabil în cursul zilei și al nopții, fiind maxim noaptea, cînd fotosinteza este întreruptă (fig. 300).

O parte din plante sînt consumate de animale, care eliberează $CO_2$ prin respirație. După moarte, substanțele organice din structura lor sînt degra-

date de microorganisme, cu producere de $CO_2$, care se reîntorc, de asemenea, în atmosferă.

Circulația $CO_2$ (atmosferă ⇄ sol și atmosferă ⇄ ocean), ca și circulația $CO_2$ ⇄ C organic sînt foarte rapide datorită faptului că rezervorul de $CO_2$ este relativ limitat cantitativ. În fiecare an sînt fixate în structura plante-

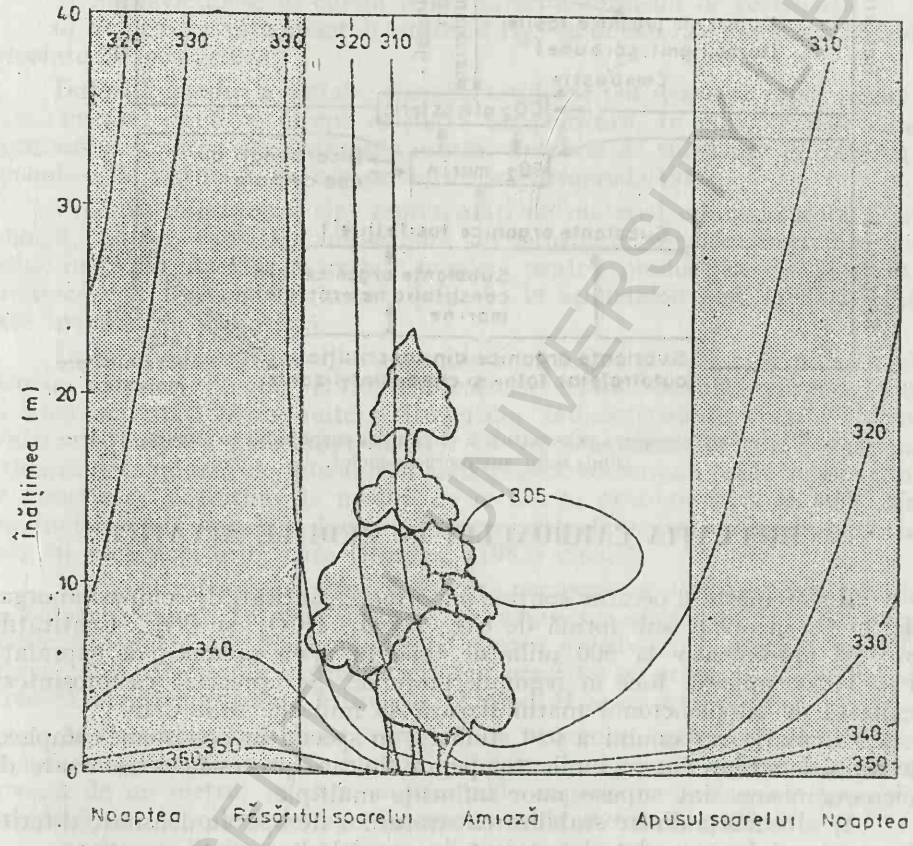



Fig. 300. — Distribuția verticală a dioxidului de carbon în aer în jurul unei păduri variază în raport cu perioada din zi. În perioada de iluminare maximă (amiază), concentrația $CO_2$ deasupra arborilor scade, datorită fotosintezei, la 305 ppm, în timp ce noaptea, datorită respirației la nivelul solului, poate crește pînă la 400 ppm (după Bolin, 1970).

lor verzi cantități mari de $CO_2$ și în fiecare an cantități mari se reîntorc în atmosferă. După Stanier, Adelberg și Doudoroff (1970), la randamentul actual al fotosintezei, în absența acestui fenomen de recirculare, $CO_2$ total din atmosferă ar fi complet epuizat în aproximativ 20 de ani. Estimări mai optimiste apreciază această durată la 40—50 de ani, după care orice formă de viață ar înceta să mai existe.

Circulația biogeochimică a carbonului implică existența a două cicluri distincte și anume, unul cu evoluție terestră și celălalt oceanic, interconectate dinamic la interfața cu atmosfera (fig. 301).

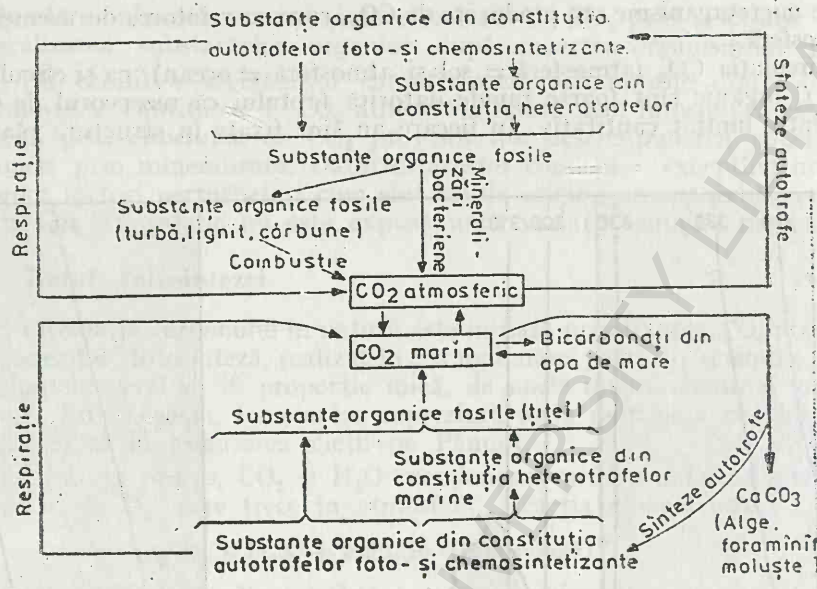



Fig. 301. — Reprezentarea schematică a circulației carbonului în natură, evidențiind rolul microorganismelor.

## CIRCULAȚIA CARBONULUI ÎN MEDIILE ACVATICE

Mediul marin și oceanic conține importante cantități de compuși anorganici ai C, dizolvați sub formă de $CO_2$, $H_2CO_3$, $HCO_3^-$ și $CO_3^{2-}$. Cantitățile lor sînt aproximativ la 500 miliarde tone în apele oceanice de suprafață și la 34 500 miliarde tone în regiunile profunde. Se apreciază că fotosinteza realizată de fitoplanctonul marin fixează 40 miliarde tone C/an.

Circulația carbonului a fost studiată, în special în ecosisteme complexe de tipul lacurilor din regiunile temperate, în care procesele determinate de microorganisme sînt supuse unor influențe multiple:

1) alternanța dintre stabilizarea straturilor de apă cu densitate diferită și amestecul lor complet determinat în special de variații sezoniere;

2) variații în intensitatea luminii, a concentrației $O_2$ sau a temperaturii;

3) variații în concentrația unor elemente care influențează intensitatea fotosintezei și rata circulației C în ecosistem (Ormerod, 1983).

În lacurile oligotrofe, fotosinteza este efectuată predominant de diferite tipuri de alge eucariote, în timp ce cianobacteriile pot fi nedetectabile. Pe măsură ce procesul de eutrofizare înaintează, cianobacteriile încep să domine numeric și producția fotosintetică în epilimnion crește.

Ormerod (1983) insistă asupra unor particularități ale cianobacteriilor care le permit să competiționeze cu algele eucariote, deși fac același tip de fotosinteză:

1) Necesită, comparativ, o energie joasă de menținere (1/10 din cantitatea necesară algelor). De aceea pot să crească bine la intensități mici ale luminii și să facă fotosinteză la adîncimi mai mari. Pigmenții de

antenă (ficobiliproteine) absorb lumina cu lungimea de undă cel mai puțin absorbită de apă (500—650 nm).

2) Unele fixează azotul molecular.

3) Multe au vacuole cu gaze, care le permit să-și regleze poziția optimă în coloana de apă.

4) Structura filamentoasă împiedică înglobarea lor de prădători.

5) Supraviețuiesc în cursul iernii datorită formelor de rezistență.

6) Se pot dezvolta anaerob, utilizînd $H_2S$ ca donator de electroni, făcînd fotosinteză anoxigenică.

Datorită acestor avantaje, cianobacteriile se pot dezvolta rapid primăvara, imediat după ce începe creșterea temperaturii. În plus, celulele care supraviețuiesc iarna sechestrează cantități notabile de substanțe de rezervă, lipsindu-i de nutrienți pe competitorii lor (Ormerod, 1983).

Produșii fotosintezei sînt reprezentați de material celular, cărora li se adaugă, uneori, cantități importante de substanțe organice excretate de celule în mediu. Acestea reprezintă pierderi pentru producerea de biomasă, deoarece sînt frecvent degradate oxidativ în epilimnion pînă la $CO_2$, care este înapoiat în atmosferă.

În hipolimnionul lacurilor meromictice, mediul acvatic este permanent anoxic. Biebl și Pfennig (1979) evidențiază faptul, oarecum surprinzător, al unei activități neobișnuite a bacteriilor fotosintetizante verzi *(Chlorobiales)* și purpurii *(Rhodospirillales)*. Ei citează cazuri în care producția primară determinată de fotosinteza anoxigenică bacteriană poate reprezenta, în funcție de condițiile de mediu, de la cîteva procente pînă la 80% din producția totală anuală a lacului. Procesul este favorizat de unele particularități biologice, între care Ormerod (1983) citează:

1) Capacitatea bacteriilor sulfuroase purpurii de a-și modifica poziția în coloana de apă. În zilele însorite, ele utilizează dimineața $H_2S$ din straturile superioare ale hipolimnionului, pentru a coborî la adîncimi mari în cursul zilei. Bacteriile purpurii nu sînt omorîte în prezența $O_2$ și pot să crească chemoautotrof la întuneric, oxidînd $H_2S$ cu ajutorul $O_2$.

2) Bacteriile sulfuroase verzi strict anaerobe, adaptate să trăiască la intensități foarte mici ale luminii, pot forma o „placă" bacteriană, uneori groasă de un metru, în care, în straturile superioare predomină bacteriile purpurii, iar în cele inferioare bacteriile verzi (Ormerod, 1983).

**Utilizarea carbonului fixat prin fotosinteză.** Materialul celular produs prin fotosinteza oxigenică în epilimnion intră în rețeaua trofică a lacului. Final, după procese mai mult sau mai puțin complexe, este degradat la $CO_2$ și refixat de fototrofe în epilimnion sau eliberat în atmosferă. Fac excepție substanțele organice excretate în mediu și cele rezultate din liza celulară determinată de fagi, unii prădători (mixobacterii, protozoare etc.), care favorizează creșterea bacteriilor heterotrofe.

Aproximativ 1/4 din materialul celular sedimentează în hipolimnion sub formă de zooplancton și fitoplancton mort, resturi diferite din epilimnion. O parte este descompus pe parcurs, în cursul coborîrii spre fund, iar restul este degradat anaerob în stratul superior al sedimentului. Procesul degradativ este complex, evoluează mai lent decît în aerobioză, produșii rezultați din hidroliza celulelor moarte sînt fermentați cu formare de acizi grași (acizi acetic, propionic, butiric, lactic), $H_2$ și $CO_2$.

În ecosistemele care conțin cantități suficiente de sulfat sau nitrat, bacteriile specifice pot realiza stadiile finale de conversie a produșilor rezultați din fermentație la $CO_2$.

În sedimentele de apă dulce și, în general, în cele cu puțin sulfat, mineralizarea nu duce la stadiile finale. O treime sau 2/3 din produșii cu C din sediment sînt convertite utilizînd hidrogenul produs prin fermentație la metan și $CO_2$ (Ormerod, 1983):

$$HCO_3^- + H^+ + 4\,H_2 \rightarrow CH_4 \text{ și } 3\,H_2O$$

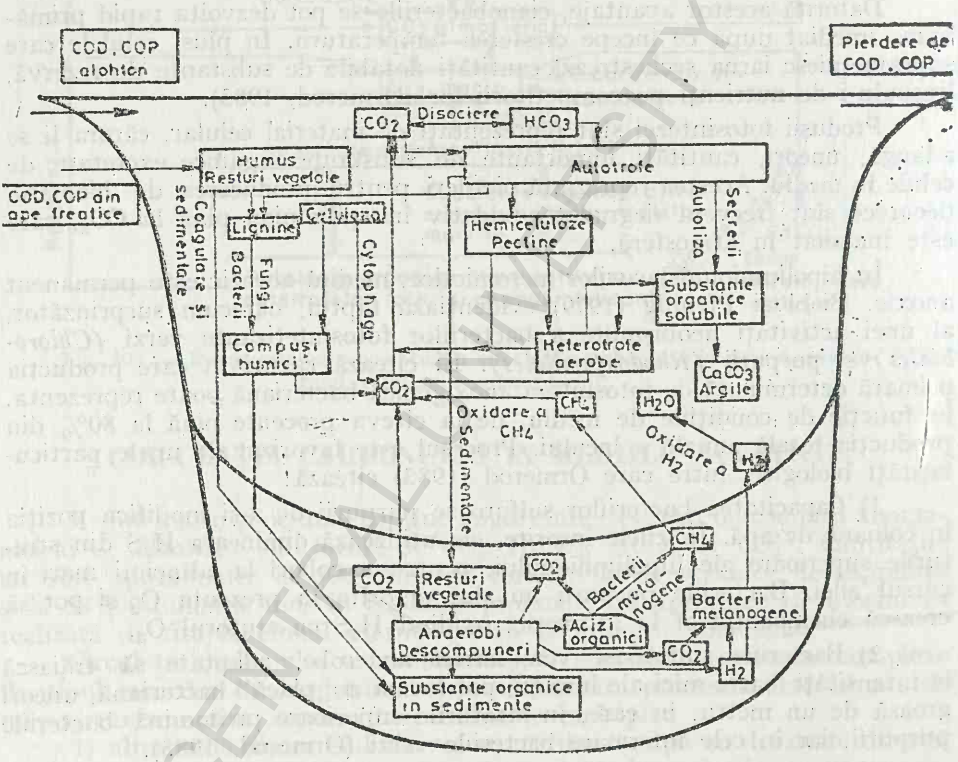



Fig. 302. — Reprezentarea schematică a ciclului carbonatului într-un lac tipic de apă dulce, evidențiind rolul-cheie al microorganismelor: COD = carbon organic dizolvat; COP = carbon organic particulat; F = fotosinteză; R = respirație (după Wetzel, 1976).

În sfîrșit, în cursul perioadelor geologice, o parte din compușii nedegradați se poate acumula în anumite habitate în cantități enorme și, devenind inaccesibile comunităților biologice, evoluează spre stadii de combustibili fosili (țiței, gaze naturale). Figura 302 prezintă sintetic complexitatea căilor de circulație a carbonului în diferite regiuni ale unui lac cu apă dulce.

# DEGRADAREA BIOLOGICĂ A CONSTITUENȚILOR VEGETALI

Cantitativ, cele mai abundente substanțe organice cu carbon derivate din plante sînt reprezentate de constituenții pereților celulelor vegetale alcătuiți din trei componenți chimici majori: 1) polizaharide; 2) lignină și 3) substanțe accesorii, nestructurale. Ele sînt reunite de Fan, Gharpuray și Lee (1987) sub denumirea, incorectă din punct de vedere chimic, de „materiale celulozice".

După Jones (1969), în cazul țesuturilor lemnoase, în medie, celuloza reprezintă 50%, hemicelulozele 20%, lignina 25% și substanțele accesorii 5%. În realitate, proporția diferiților constituenți este diferită nu numai de la o specie la alta, ci chiar în cadrul speciei. În cazul speciilor de esență moale, conținutul în lignină este mai mare, în timp ce la cele de esență tare predomină cantitativ celuloza (fig. 303). Hemiceluloza este întîlnită în cantități aproximativ egale la ambele tipuri de plante lemnoase.

**Polizaharidele** sînt reprezentate de glucide cu greutate moleculară mare, avînd rol predominant structural. În afară de celuloză și hemiceluloze, pereții celulelor vegetale conțin, în funcție de natura plantelor din care provin, cantități variabile de substanțe pectice (cu rol de liant), manani, galactani, glucani și xilani etc., care pot exista separat sau asociați.

**Lignina**, probabil cel mai complex și mai puțin definită structural dintre constituenții lemnului, reprezintă 20—35% din structura acesteia.

**Substanțele accesorii — nestructurale** includ o varietate uimitoare de substanțe extractibile (terpeni, fenoli, rășini etc.) sau neextractibile (regăsite în cenuși ca oxalați, carbonați, cristale de siliciu). Ele măresc rezistența celulozei la degradare și la atacul insectelor (Fan, Gharpuray și Lee, 1987).

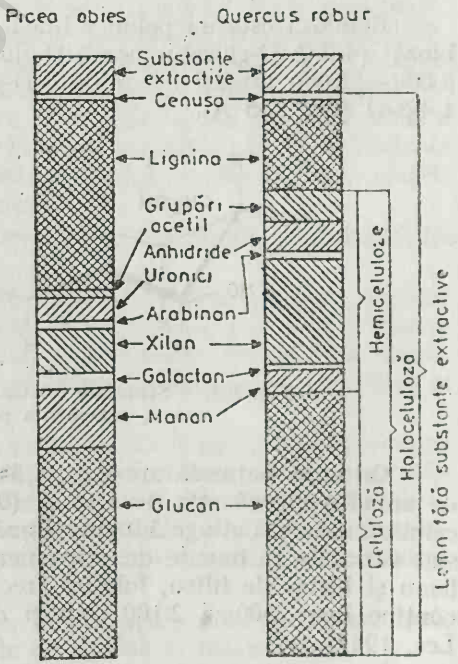



Fig. 303. — Structura chimică comparată a lemnului de esență moale (molid) și de esență tare (stejar) (după Browning, 1970).

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

# DEGRADAREA BIOLOGICĂ A CELULOZEI

Celuloza este un constituent major al materialelor vegetale și cel mai abundent material organic prezent în natură. În plus, este un compus reînnoit anual prin fotosinteza plantelor verzi, estimat de Coughlan (1985) la $4 \times 10^{10}$ tone/an. După datele Academiei Naționale de Științe din Washington (1979), fotosinteza produce anual 10—15 t celuloză per om. Fan, Gharpuray și Lee (1987) apreciază cantitatea de celuloză disponibilă în natură la 324 miliarde $m^3$.

Studiată inițial de Hoppe-Seyler (1883) și apoi de Bary (1886), degradarea biologică este un proces cu importanță fundamentală în circulația carbonului în natură.

În afară de celuloza prezentă în țesuturile vegetale vii, cantități imense de celuloză se găsesc, sub formă de resturi vegetale, în agricultură și silvicultură, în excrețiile animale, precum și în reziduurile orășenești (ca hîrtie, materiale de împachetat etc.).

Dintre toate aceste resurse, numai o mică fracțiune este utilizată curent pentru producerea de bunuri (material de construcție, producerea de hîrtie, lacuri, explozive, membrane etc.). Cea mai mare parte din țesuturile vegetale este degradată de către microorganismele capabile să producă celulaze, care folosesc țesuturile ca sursă de C și energie.

## Structura moleculară a celulozei

Celuloza este un polimer liniar, alcătuit din unități repetate de celobioză (4-0-(β-D-glucopiranozil)-D-glucopiranoză (fig. 304), respectiv din 8 000—12 000 unități de anhidro-D-glucoză, unite prin legături glicozidice 1,4-β-D (fig. 305 A).

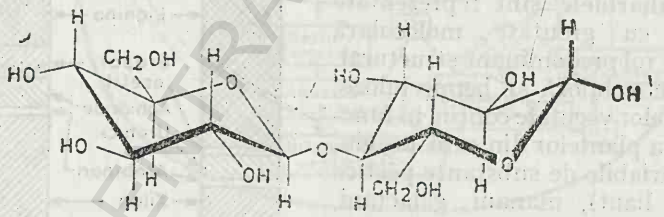


Fig. 304. — Structura celobiozei, unitatea de structură repetată în compoziția polimerului de celuloză.

Celuloza naturală are g.m. $1,5 \times 10^6$ dal. Cum mărimea unei unități de anhidroglucoză este de 5,15 Å (0,515 nm), lungimea unei molecule de celuloză naturală atinge 5,0 μm. Numărul unităților și gradul de polimerizare sînt variabile în funcție de proveniența moleculelor. Celuloza din pasta de lemn și hîrtia de filtru, folosită frecvent în studiile de degradare *in vitro*, conține între 500 și 2 100 unități de anhidroglucoză (Fan, Gharpuray și Lee, 1987).

În condiții de laborator sau industriale se pot obține celuloze modificate fizic sau chimic prin tratare cu acizi sau alcali, sau substituite chimic (ca, de exemplu, trinitrofenil-celuloza sau carboximetil-celuloza (CMC).

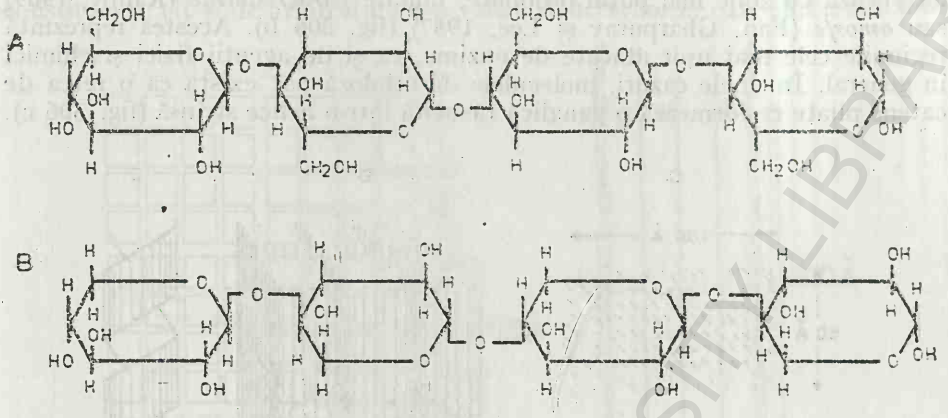


Fig. 305. — Structura chimică a celulozei (A) și a hemicelulozei (B).

## Structura și morfologia fibrelor de celuloză

Deși structura primară a celulozei este relativ simplă, structura sa terțiară (sau cuaternară) este extrem de complicată, fapt care explică marea sa rezistență la degradarea enzimatică. Cunoașterea modului de grupare a moleculelor individuale de celuloză și a organizării lor în fascicule este esențială pentru înțelegerea proprietăților lor fizice și chimice, și de rezistență.

În structurile naturale, ca și în cazul altor polimeri lineari hidrofili, ~ 100 molecule individuale de celuloză sînt legate împreună pentru a forma *fibrile elementare* sau *protofibrile*. Ele au lungimea de ~ 100 Å, lățimea de 40 Å și grosimea de 30 Å, și sînt alcătuite din molecule de celuloză aliniate paralel și ferm legate prin legături de H. Deși legăturile de H individuale sînt relativ slabe, împreună, pe măsură ce gradul de polimerizare crește, ele formează o forță puternică de asociere.

Fibrila elementară este cea mai mică unitate structurală a microfibrilelor și a fibrelor.

Un număr de ~ 20 (± 5) fibrile elementare sînt agregate într-un fascicul lung și subțire numit *microfibrilă*. Prin asocierea a ~ 250 microfibrile rezultă o *fibrilă*, iar din unirea a 1 500 fibrile rezultă *fibra macroscopică* vizibilă cu ochiul liber (Siegel și Heyn, (1969), citați de Toma și Anghel, 1985).

Pe baza studiilor de microelectronografie, Cowling (1975) a propus următorul model de structură a microfibrilelor de celuloză: fiecare microfibrilă, avînd pe secțiuni transversale dimensiuni cuprinse între 50,0 Å × × 100,0 Å, are o regiune centrală („Core") alcătuită din molecule de celuloză, cu aranjare regulată perfectă, înconjurate de o „teacă" paracristalină (fig. 306 a).

La bumbac, această teacă conține, în principal, molecule de celuloză, iar în cazul plantelor lemnoase molecule de lignină și hemiceluloză.

De-a lungul microfibrilelor, moleculele de celuloză conțin porțiuni extinse, cu organizare foarte ordonată, corespunzînd *regiunilor cristaline* (deoarece prezintă un model de difracție de tip cristalin în raze X). Ele

alternează cu zone mai puțin ordonate, numite *paracristaline* (Ranby, 1969) sau *amorfe* (Fan, Gharpuray și Lee, 1987) (fig. 306 b). Acestea reprezintă regiunile cele mai ușor atacate de enzime, ca și de agenții fizici și chimici în general. În unele cazuri, moleculele de celuloză pot exista ca o rețea de catene pliate ce formează o panglică răsucită într-o helice strînsă (fig. 306 c).

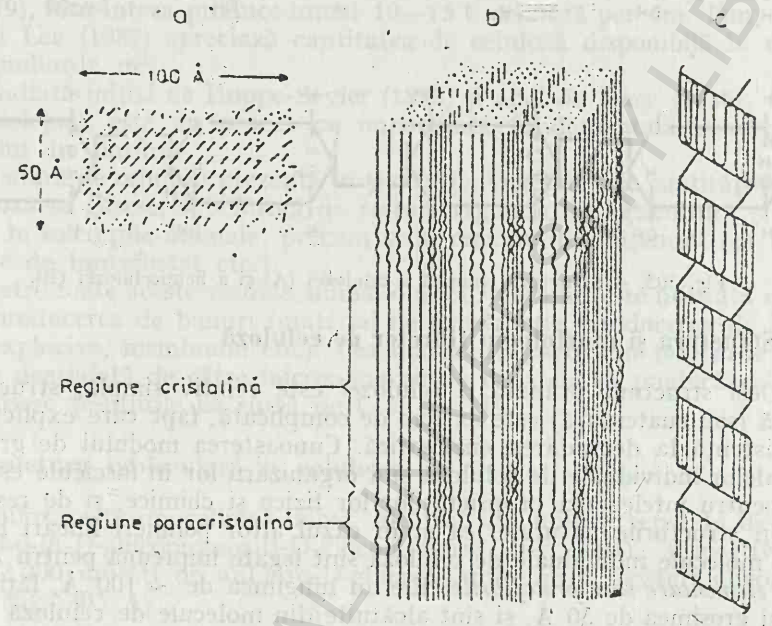



Fig. 306. — Reprezentarea schematică a structurii microfibrilelor de celuloză (după Cowling, 1975).

O consecință a modului extrem de ordonat de organizare a fibrelor de celuloză naturală, nici o moleculă de apă sau de enzime nu poate intra în structura lor. Aceasta explică de ce este celuloza inertă în intestinul multor animale. Pretratarea *in vitro* cu acizi sau alcali creează structuri deschise, ce favorizează relativ ușor atacul enzimatic.

Figura 307, după Fengel (1971), prezintă organizarea ultrastructurală a microfibrilelor din componenții pereților celulari și ai lemnului. În acest model, fibrilele elementare, cimentate între ele prin polioze, ca hemiceluloza, formează o microfibrilă. Aceasta este la rîndul său înconjurată de lignină și un strat de polioze, care o protejează de degradare.

În celuloza naturală, regiunea cristalină poate reprezenta pînă la 70% din lungimea microfibrilelor.

În ansamblu, acest mod de organizare explică tăria, rigiditatea și rezistența la degradare enzimatică a structurilor vegetale formate din celuloză, căreia i se adaugă aproape întotdeauna lignină, hemiceluloză și alte polioze.

În general, substanțele organice de natură vegetală au o mare rezistență la degradarea biologică. Aceasta evoluează foarte lent și necesită, de regulă, intervenția unui număr mare de microorganisme.

Rezistența este determinată atît de structura moleculară a diferiților constituenți, cît și de arhitectura generală a structurilor în care sînt asamblați.

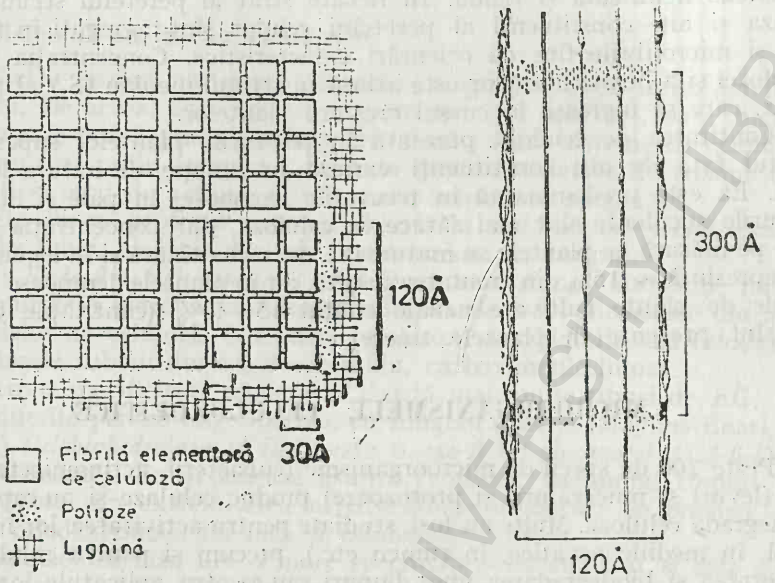



Fig. 307. — Reprezentarea grafică a modului de organizare ultrastructurală a componenților pereților celulelor lemnului (după Fengel, 1971).

Figura 308 prezintă schema generală de construcție a peretelui celulei vegetale asemănătoare unui „cablu" cu mai multe structuri concentrice: în jurul unui lumen gol, făcut impermeabil pentru apă de către lignină și

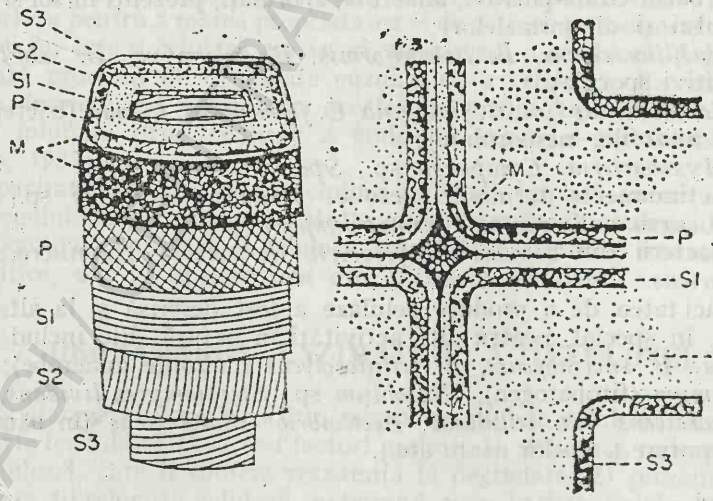



Fig. 308. — Reprezentarea schematică a structurii complexe a peretelui celulelor lemnului: M = meat (spațiu intercelular); P = perete primar; $S_1$, $S_2$, $S_3$ = pereți secundari alcătuiți predominant din lignina care impregnează o rețea de microfibrile celulozice (după Cowling, 1975).

ceruri, care oferă și rezistența chimică, elementele fibrilare formate din celuloză dau rezistență, extensibilitate și flexibilitate. Lamela mijlocie (M) este intens lignificată și rigidă. În fiecare strat al peretelui secundar (S), celuloza și alți constituenți ai peretelui celular sînt agregați în fascicule lungi și microfibrile fine cu orientări caracteristice. Concentrația maximă a celulozei și a hemicelulozelor este atinsă în stratul median ($S_2$) al peretelui celular, care se îngroașă în cursul creșterii plantelor.

Cantitatea de celuloză prezentă în țesuturile plantelor superioare și raportul față de alți constituenți variază în funcție de natura lor și de vîrstă. Ea este predominantă în țesuturile lemnoase, în paie și în frunze. Țesuturile suculente sînt mai sărace în celuloză, dar concentrația acesteia crește pe măsură ce plantele se maturează. În iarba tînără și în legume, celuloza reprezintă ~ 15% din greutatea uscată, iar în plantele lemnoase > 50%. Speciile de plante cultivate uzuale conțin 15—40% (cantitățile cele mai mici sînt prezente în plantele tinere).

## MICROORGANISMELE CELULOZOLITICE

Peste 200 de specii de microorganisme (eubacterii, actinomicete, microfungi (levuri și mucegaiuri) și protozoare) produc celulaze și au capacitatea de a degrada celuloza. Multe au fost studiate pentru activitatea lor în natură (în sol, în mediile acvatice, în rumen etc.), precum și pentru rolul în biodeteriorarea și biodegradarea unor bunuri sau pentru aplicațiile lor biotehnologice. Cele mai importante sînt următoarele:

### Bacterii

— *Clostridium cellulovorans, C. cellulolyticum, C. stercorarium, C. thermocellum* (bacili Gram-pozitivi, anaerobi, sporulați, prezenți în sol și în intestinul omului și al animalelor);

— *Bacillus cereus, B. licheniformis, B. polymyxa, B. subtilis* (bacili Gram-pozitivi sporulați);

— *Cellulomonas fini, C. flavigena, C. fermentans, C. uda* (bacterii Gram-variabile, mezofile, nesporulate);

— *Myxobacteria: Cytophaga* sp., *Sporocytophaga* sp.;

— Actinomicete termofile aerobe: *Thermoactinomyces* sp., *Thermomonospora curvata, T. fusca, Thermopolyspora* sp.;

— Bacterii din rumen: *Butyrivibrio fibrisolvens, Ruminococcus albus, R. flavefaciens.*

Capacitatea de a produce celulaze a fost descrisă și la alte bacterii cunoscute, în special, pentru alte activități în natură. Ele includ specii de *Bacteroides: B. succinogenes, B. cellulosolvens* (mezofile anaerobe); *Erwinia chrysanthemum* (fitopatogen), *Rhizobium* sp., *Streptomyces lividans, Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosae, Acetivibrio cellulolyticus* (în nămolul stațiilor de epurare a apelor uzate etc.).

### Fungi

Capacitatea de a produce celulaze extracelulare este larg răspîndită la fungi, fiind descrisă la levuri *(Candida pelliculosa)* și mai ales la mucegaiuri ca: *Aspergillus* sp., *Alternaria, Botrytis, Cephalosporium, Chaetomium,*

*Chrysosporium, Dematium, Fusarium, Humicola, Macrosporium, Myrothecium, Penicillium, Phanerochaete, Phoma, Trichoderma, Verticillium* etc.

### Sistemul enzimelor celulazice

Nici o enzimă nu poate asigura — singură — degradarea extensivă a celulozei. De aceea, așa cum s-a demonstrat fără echivoc, toate microorganismele care pot degrada celuloza cristalină produc sisteme de celulaze mai mult sau mai puțin complexe, formate dintr-o varietate de enzime cu specificități și mod de acțiune diferit, care acționează cooperant.

Ele au ca prototip sistemul descris la *Trichoderma reesei*, evidențiat și la alți fungi, alcătuit din trei tipuri majore de enzime:

1) *Endo-β-1,4-glucanaza (1,4-β-D-glucan-4-glucan hidrolaza*, notată cu acronimul EG) hidrolizează aleatoriu legăturile β-1,4-glicozidice din mijlocul moleculelor de celuloză. Nu atacă celobioza, dar hidrolizează celodextrinele și celulozele substituite ca, de exemplu, carboximetilceluloza.

Are o specificitate moderată. Există mai multe tipuri de EG, cu afinități diferite pentru oligozaharide cu lungimi diferite (Magnus-Enari, 1982).

2) *Celobiohidrolaza (CBH)* este o *exo-β-1,4-glucanază (1,4-β-D-glucan celobiohidrolază)*. Ea acționează asupra celulozei, secționînd treptat unități de celobioză din extremitatea nereducătoare a catenei de polimer. Hidrolizează celodextrinele, nu însă și celobioza.

Celobiohidrolaza are o mare specificitate de substrat și este capabilă să degradeze $> 80\%$ din celuloza cristalină, însă cu grade diferite de activitate în funcție de natura microorganismelor de la care provine (Wood și McCrae, 1979).

3) *β-glucozidaza (β-D-glucozid glucohidrolaza)* hidrolizează celobioza și celooligozaharidele (celotrioza, celotetroze etc.) la glucoză. Nu atacă celuloza și nici celodextrinele cu greutate moleculară mare. A fost numită și *β-glucimeraza* pentru a marca proprietatea ei de acțiune pe β-dimeri de glucoză.

Deși nu este o celulază *per se*, ci, în special, o celobioză, β-glucozidaza favorizează procesul de degradare enzimatică a celulozei. Ea îndepărtează celobioza, împiedicînd acumularea acesteia în mediu (fig. 309), care ar avea efect de inhibare prin feedback a endo- și exo-β-1,4-glucanazelor (CBH) (Mandels, 1982).

Capacitatea de a degrada celuloza naturală implică cu necesitate sinteza întregului sistem enzimatic. Multe microorganisme pot degrada celuloza parțial degradată, nu însă și celuloza naturală. Ele produc anumite enzime celulozolitice, dar le lipsește una din enzimele esențiale.

## DEGRADAREA ENZIMATICĂ A CELULOZEI

Degradarea celulozei de către microorganismele celulozolitice se realizează foarte lent datorită la trei factori majori: 1) structura ordonată cristalină a celulozei, care îi conferă rezistența la degradare; 2) prezența lignînei în structura fibrelor de celuloză, acționînd ca o barieră fizică; 3) numărul limitat al situsurilor reactive (regiunile amorfe) de atac.

Rata degradării celulozei în condiții de laborator este de 0,026%/zi în culturi pure de microorganisme și de 0,066% în culturi mixte. Creșterea vitezei de fermentație în prezența unor comunități de microorganisme s-ar

putea explica prin îndepărtarea produșilor finali toxici ai degradării de către microorganismele necelulozolitice.

Degradarea poate avea loc în aerobioză sau în anaerobioză, de către enzime extracelulare sau legate de suprafața celulelor microbiene. Ea are o eficiență maximă dacă microorganismele vin în contact direct cu substratul (Hofsten, 1975), deoarece astfel se realizează o aranjare spațială avanta-

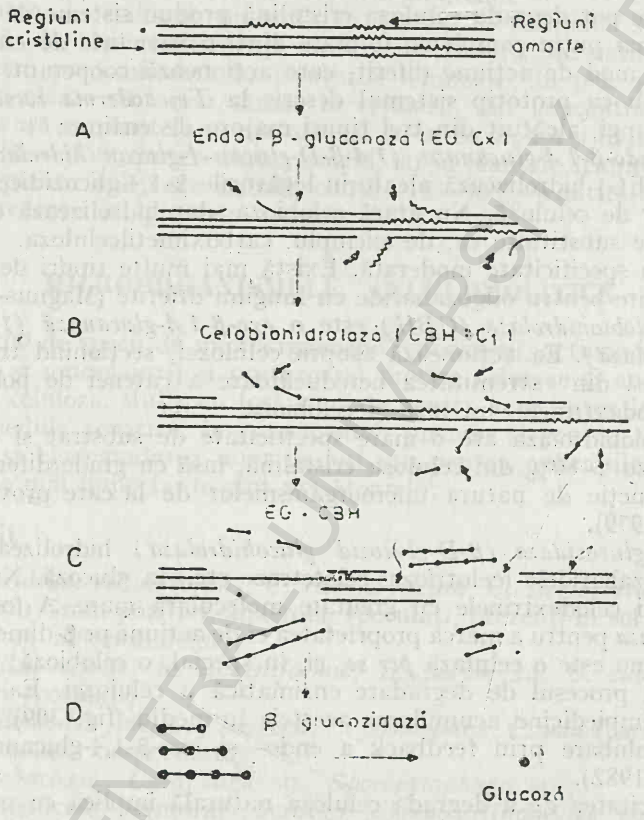



Fig. 309. — Reprezentarea schematică a etapelor secvențiale ale hidrolizei enzimatice a celulozei (după Montenecourt și Eveleigh, 1979).

joasă care asigură o mare concentrație locală de enzime. Unele enzime ca, de exemplu, β-glucozidaza bacteriană, care hidrolizează celobioza și celodextrinele cu greutate moleculară mică, sînt fie efectiv intracelulare, fie, cel mai probabil, localizate în regiunea periplasmică.

### Biochimia degradării celulozei de către fungi

În concepția clasică (Reese și colab., 1950), degradarea biologică a celulozei este un proces ce evoluează în două trepte (fig. 310): prima mediată de o enzimă nehidrolitică, $C_1$, constă în „activarea" sau dezagregarea catenelor de celuloză; 2) ulterior, enzimele hidrolitice $C_x$, exo- și endoglucanazice, realizează hidroliza polimerului la unitățile sale de construcție.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ipoteza presupune că microorganismele care cresc pe celuloza naturală („cristalizată") produc ambele enzime, $C_1$ și $C_x$, iar cela care degradează numai celulozele degradate sau substituite chimic (ca, de exemplu, carboximetilceluloza) produc numai enzime $C_x$. Ipoteza nu a fost verificată fără echivoc, iar unele date experimentale chiar o contrazic. Enzimele activatoare nehidrolitice nu au fost izolate. Activitatea $C_1$ evidențiază la *T. koningii* și *F. solani* este determinată de celobiohidrolaze (Wood și McCrae, 1975).

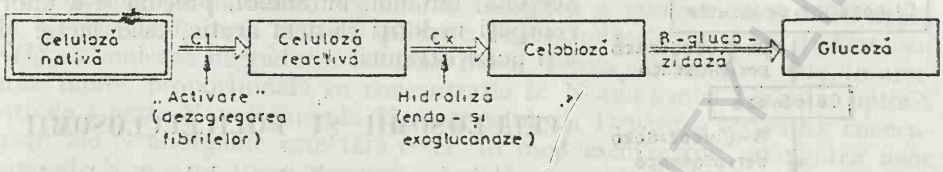



Fig. 310. — Reprezentarea schematică a concepției clasice privind degradarea biologică a celulozei native sub acțiunea enzimelor fungice.

Concepția actuală se bazează pe cunoștințele referitoare la structura fibrelor de celuloză și a sistemelor enzimatice fungice descrise în special la *T. reesei*, *T. koningii* ș.a. Ea are la bază ideea acțiunii sinergice a enzimelor produse de fungii celulozolitici. Procesul implică atacul inițial al regiunilor amorfe de către endoglucanaze, care fragmentează fibrilele de celuloză, expunînd noi extremități nereducătoare libere la acțiunea celobiohidrolazelor, ce îndepărtează unitățile de celobioză. Final, acestea sînt hidrolizate de β-glucozidaze la glucoză, unitatea fundamentală de construcție (fig. 309) (Eriksson, 1969; Montenecourt și Eveleigh, 1979).

Ipoteza a fost verificată și prin urmărirea procesului prin microscopie electronică (White și Brown, 1981): hidroliza completă necesită prezența ambelor enzime EG și CBH. Singură, endoglucanaza hidrolizează regiunile amorfe ale catenelor de glucan de pe suprafața fibrilelor de celuloză. În ansamblu, degradarea biologică a celulozei de către fungi este rezultatul acțiunii sinergice a enzimelor sistemului celulazic. Sinergismul, încă incomplet elucidat, este bazat pe faptul că EG atacă regiunile amorfe ale fibrelor de celuloză, creînd situsuri de acțiune pentru CBH, care acționează asupra regiunilor cristaline ale fibrei. Final, β-glucozidazele realizează ultima treaptă a hidrolizei și împiedică formarea și/sau acumularea celobiozei care inhibă CBH (Robson și Chambliss, 1989).

### Celulazele bacteriene

Bacteriile produc o varietate de endoglucanaze cu activitate slabă asupra celulozei cristalizate. Capacitatea de a produce celobiohidrolaze este excepțională, fiind evidențiată pînă în prezent numai în două cazuri. Beguin (1990) menționează faptul că cel puțin unele endoglucanaze bacteriene au și activitate exoglucanazică, fapt care permite ca nevoia de a produce enzime distincte din această categorie să nu fie absolută. Este, de asemenea, posibil că incapacitatea de a izola exoglucanaze de la bacterii s-ar datora instabilității lor neobișnuite, din cauza căreia ar fi inactivate în timpul izolării.

Spre deosebire de celulazele fungice, cele bacteriene nu acționează sinergic. După Ramasamy și Verachtert (1980), endoglucanaza extracelulară

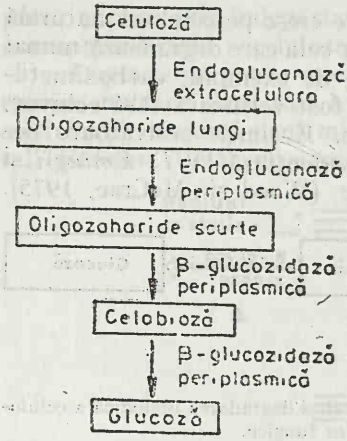



Fig. 311. — Mecanismul celulozolizei bacteriene (după Ramasamy și Verachtert, 1980).

degradează celuloza la scurte catene oligozaharidice (fig. 311). Acestea sînt introduse în spațiul periplasmic unde sînt degradate în continuare de endoglucanaze și β-glucozidaze periplasmice.

Degradarea bacteriană a celulozei determină producerea de zaharuri solubile, etanol, acetonă, butanol, butandiol, precum și a unor compuși nedoriți ca acid acetic, acid lactic și alți acizi organici.

## CELULOSOMII ȘI POLICELULOSOMII

Adeziunea specifică a celulazelor de fibrele de celuloză a fost descrisă de Bayer (1983) și atribuită unui *factor de legare* („Cellulose binding factor"). Lucrînd cu *Clostridium thermocellulolyticum*, Lamed și colab. (1983) au descris capacitatea celulazelor extracelulare de a se agrega sub forma unor complexe proteice macromoleculare, pe care le-au numit *celulosomi*.

Ei sînt complexe multicelulazice, vizibile prin microscopie electronică, cu Ø de 18 nm, g.m. $2{,}1 \times 10^6$ dal, rezistente la degradare cu agenți fizici și chimici. Pot fi scindate cu sodiu dodecil sulfat la 14—18 polipeptide, cu g.m. 48—210 kdal, avînd, cu o singură excepție, activitate celulazică.

*Proteina majoră (S8)* a complexului are activitate endo-β-glucanazică.

*Proteina S1, necimatică*, expusă pe suprafața complexului, ar avea rolul de organizare a componenților acestuia într-o structură coerentă, și/sau de ancorare a complexului de celula bacteriană și de fibre.

Celulosomii ar putea fi structuri universale la bacteriile celulozolitice. Ei au particularități de mărime, de organizare a subunităților în complex, de legare de celule etc., diferite de la o bacterie la alta. Sinteza lor este codificată de 14—18 gene.

**Rol.** Celulosomii reprezintă structurile majore de legare de suprafața fibrelor de celuloză. Ei au posibilitatea de a forma structuri policelulosomice, cu dimensiuni mai mari (60 nm) și g.m. $50—80 \times 10^8$ dal, localizate pe suprafața bacteriilor, fie discontinuu, la intervale periodice, fie asemănător unui material capsular. După legarea de fibrele de celuloză, ei delimitează „coridoare de contact" al căror rol este de a acționa ca bariere de difuzie ce împiedică „pierderea" compușilor de degradare (zaharurilor hidrolizate) în mediu, favorizînd „pomparea" lor activă în celulă. Policelulosomii se pot desprinde de celulele bacteriene și de fibrele de celuloză și se pot disocia pentru a forma celulosomi și enzime libere.

Celulosomii sînt structuri polifuncționale:

1) asigură menținerea celulazelor, împiedicînd difuzia și diluția lor în mediu;

2) asigură legarea bacteriilor celulozolitice de substratul acțiunii lor;

3) favorizează clivarea simultană a structurii substratului în puncte multiple și eficiența mărită a degradării. Procesul ar fi realizat de celulosomii

individuali (incluși în structura policelulosomilor), dispuși de-a lungul întregii suprafețe a bacteriilor, în așa fel încît refacerea legăturilor glicozidice este improbabilă;

4) asigură menținerea produșilor rezultați din degradare (în particular a celobiozei) și transferul eficient al acestora (asigurat de componenții fibroși din zona de contact) spre celulă, în care sînt înglobați prin acțiunea unui sistem adecvat de transport.

În condiții naturale, degradarea biologică a celulozei este influențată de o serie de factori. Astfel, aplicarea îngrășămintelor azotate (nitrat sau $NH_4^+$) stimulează degradarea celulozei în sol. Viteza celulozolizei este, în anumite limite, proporțională cu concentrația în N anorganic. Condiția optimă este de 1 parte N anorganic la 35 părți celuloză. Depășirea anumitor concentrații ale N anorganic este fără efect. În mod asemănător, adăugarea unor surse de N organic (uree, peptonă, cazeină, gunoi de grajd) are un efect stimulator asupra celulozolizei.

Procesul este, de asemenea, influențat de temperatură (diferită pentru microorganismele mezofile și termofile), de umiditate, de gradul de aerare, de proporția ligninei și de prezența altor glucide (xilanii și alte glucide din cocenii de porumb favorizează degradarea celulozei).

Condițiile de pH și de aerare a solului influențează natura microorganismelor. Astfel, la pH 5,5 predomină fungii filamentoși, la pH 5,7—6,2 fungii și *Cytophaga*, iar la pH alcalin asociațiile bacterii și fungi. În aerobioză sînt activi fungii și unele bacterii aerobe sau facultativ anaerobe. În anaerobioză, fungii au un rol minor.

## Perspectivele aplicațiilor practice

Degradarea celulozei de către microorganisme are o serie de aplicații practice efective sau potențiale ca, de exemplu: producerea de biomasă furajeră („Single-cell protein"), producerea de biopolimeri, etanol, obținerea de produse rafinate, consumate direct ca aliment (glucoza izomerizată ca îndulcitor) sau ca substrat pentru fermentație în industria chimico-farmaceutică (antibiotice, acid gluconic, acid citric, L-aminoacizi, acetonă, butanol etc.); prodcerea de biogaz (proces încă necontrolat, datorită duratei îndelungate și instabilității sistemului implicat în fermentație).

Unele microorganisme sînt folosite ca producători de enzime cu utilizare medico-farmaceutică sau industrială (*Trichoderma reesei* produce ~ 30 g celulaze/litru (Pourquié, 1988; Béguin, 1990).

Dezvoltarea biologiei moleculare și, în particular, a ingineriei genetice oferă perspectiva obținerii unor tulpini de microorganisme apte să degradeze cu mare eficiență celuloza, asigurînd valorificarea optimă a cantităților imense disponibile în natură. Există posibilitatea creării de molecule de celulaze cu proprietăți dorite, cu activitate specifică superioară, stabilitate termică și rezistență la inhibiția prin feedback. De asemenea, este posibilă îmbunătățirea activității celulazelor bacteriene prin „construcția" unor bacterii care sintetizează aceste enzime constituțional și nerepresibil, prin clonarea și amplificarea unor gene ce codifică celulaze cu acțiune sinergică (Robson și Chambliss, 1989). Aceste cercetări sînt necesare deoarece celulazele bacteriene, produse în cantități mult mai mici decît cele fungice, au, după purificare, o

activitate egală sau chiar mai mare decît cea a fungilor. În plus, bacteriile cresc mai ușor decît fungii și au o structură genetică mai simplă și deci mai ușor de prelucrat pentru reprogramarea genetică.

## DEGRADAREA MICROBIANĂ A HEMICELULOZELOR

Hemicelulozele, polizaharide asociate cu celuloza în structura peretelui celulelor vegetale, reprezintă constituenți majori ai plantelor care sînt adăugați anual în cantități enorme în sol. De aceea, degradarea lor reprezintă o etapă importantă în circulația carbonului în natură.

Cantitativ, hemicelulozele reprezintă principala fracțiune necelulozică a polizaharidelor vegetale, reprezentînd 5—25% din greutatea uscată a acestora, în funcție de specie și de vîrsta plantelor. Localizate în special în peretele secundar, alături de celuloză și lignină, reprezintă, împreună cu pectinele, moleculele care asigură cimentarea microfibrilelor, conferind coerența și rezistența ansamblului.

### Structura chimică

Hemicelulozele sînt polizaharide, care, după izolare din țesuturile vegetale, prin tratare cu acizi minerali la cald, eliberează pentoze, hexoze și, uneori, acizi uronici. Pentozele sînt reprezentate de xiloză sau arabinoză, iar hexozele de manoză sau galactoză. Acizii uronici, legați de alți constituenți ai peretelui celular, sînt reprezentați de acidul glucuronic ($C_6H_{10}O_7$) sau de acidul galacturonic ($C_6H_{10}O_5$).

Rezultă că denumirea de hemiceluloze, atribuită probabil sub impresia asocierii strînse cu celuloza în structura peretelui celular, este incorectă din punct de vedere chimic (Alexander, 1961).

Hemicelulozele apar sub forma unor polimeri lineari alcătuiți dintr-o singură pentoză (pentozani) sau hexoză (hexozani). Pentozanii sînt, în funcție de natura moleculelor componente, xilani sau arabani, iar hexozanii, manani sau galactani. Hemicelulozele care conțin acizi uronici sînt numite *hemiceluloze poliuronidice*, iar cele lipsite de aceștia, *celulozani*. În cazul unor hemiceluloze cu structură complexă, denumirea este raportată la componentul glucidic eliberat în proporția cea mai mare prin hidroliză chimică.

După Alexander (1961), cel mai important celulozan este *xilanul*, component major al peretelui celulei vegetale. El poate fi format exclusiv din 50—150 de resturi de xiloză reunite prin legături β-1,4 (fig. 305 B) sau poate conține cantități mici de L-arabinoză (o moleculă de arabinoză la fiecare 18—20 de unități de xiloză la *Stipa tenacissima*).

*Arabanii* sînt prezenți la unele plante superioare la care sînt asociați, frecvent, cu substanțele pectice din peretele celular primar.

*Mananii* apar sub forma unor molecule lungi formate din 50—80 de resturi de manoză. Pot fi asociați cu glucoză, ca glucomanani, sau cu galactoză, ca galactomanani.

*Galactanii*, rari în stare pură, apar sub formă de arabinogalactani sau, după cum s-a mai menționat, ca galactomanani.

*Hemicelulozele poliuronidice* sînt prezente rar în forme libere. Cel mai frecvent sînt asociate intim cu alți constituenți ai peretelui celular în com-

plexe lignopolizaharidice. Ele apar ca polimeri de xiloză și acid glucuronic (un rest de acid glucuronic la fiecare 7—19 resturi de xiloză) sau de arabinoză și acid galacturonic.

După Fan, Gharpuray și Lee (1987), hemicelulozele determină deosebirile dintre lemnul de esență tare (bogat în polimeri de xilan) și cel de esență moale (bogat în manan și avînd doar cantități mici de xilan).

### Degradarea enzimatică a hemicelulozelor

Este relativ puțin studiată. Datorită structurii și greutății moleculare mari, inițial, degradarea este realizată de hemicelulaze extracelulare și evoluează în două etape succesive:

1) prima etapă are drept rezultat conversia moleculelor mari polimerice la unități de construcție sau la oligoglucide (xiloză și respectiv xilobioză sau xilotrioză în cazul xilanului);

2) cea de-a doua etapă corespunde utilizării moleculelor mai simple ca sursă de carbon și energie.

În urma procesului de degradare rezultă $CO_2$, $H_2O$, glucide simple și biomasă microbiană.

Hemicelulazele sînt de două tipuri în funcție de modul lor de acțiune. De exemplu, unele xilanaze, sînt enzime cu activitate de tip *endo*, deoarece scindează legăturile β-1,4 din interiorul catenei polizaharidice. Alexander (1961) insistă asupra denumirii incorecte a enzimei care nu atacă monomerii de xiloză, ci polimerul. Denumirea conformă cu modul de acțiune este cea de xilozidază.

Alte hemicelulaze sînt de tip *exo* și atacă polimerul la nivelul extremităților libere, eliberînd monomeri de xiloză sau dimeri (xilobioză).

**Microorganismele active** sînt reprezentate de bacterii (*Achromobacter, Bacillus, Cytophaga, Pseudomonas, Sporocytophaga, Streptomyces, Vibrio* etc.) sau fungi (*Alternaria, Aspergillus, Chaetomium, Coriolus, Helminthosporium, Penicillium, Polyporus, Rhizopus, Trichoderma, Trichotecium* ș.a.

Alexander (1961) a evidențiat un anumit grad de selectivitate în acțiunea lor. Astfel, xilanul este degradat

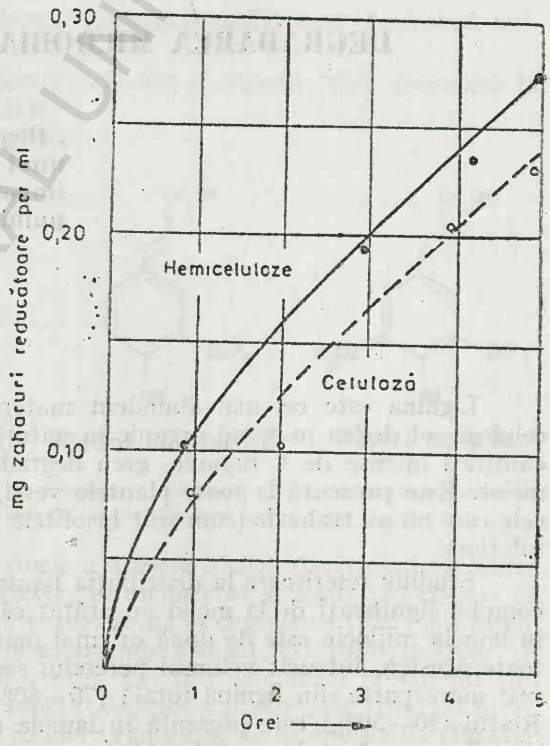



Fig. 312. — Producerea de zaharuri reducătoare în cursul hidrolizei enzimatice a celulozei și hemicelulozelor (după van Sumen, De Preter și Ledingham, 1957).

în special de *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Vibrio* sp. și de fungi ca *Aspergillus, Rhizopus* și *Zyorhynchus*. Galactanii sînt degradați în special de bacterii aerobe și anaerobe (inclusiv actinomicete din genul *Streptomyces)* și de fungi ca *Aspergillus, Cunninghamella, Humicola, Penicillium* și *Trichoderma*.

Inițial, după depunerea resturilor vegetale în sol, degradarea hemicelulozelor are loc într-un ritm mai alert, după care continuă cu o viteză încetinită. Situația s-ar datora heterogenității structurale a polimerului de hemiceluloze, care conțin regiuni mai ușor degradabile, alternînd cu regiuni mai rezistente. Degradarea este mai rapidă decît cea a celulozei (fig. 312) și mai intensă în aerobioză decît în anaerobioză.

După datele lui Norman (1930), citat de Alexander (1961), după patru zile, microorganismele degradează 43,5% din hemiceluloza paielor de ovăz și numai 2,3% din celuloză. În aerobioză, în interval de o lună, sînt degradate 6,2% din hemiceluloze și 56,2% din celuloză. În anaerobioză, în același interval, degradarea determină dispariția a 26,8% și respectiv 9,8%. Aceste date validează o serie de observații care demonstrează o încetinire a ritmului de degradare în solurile băltite și mai ales în condiții de anaerobioză.

## DEGRADAREA MICROBIANĂ A LIGNINEI

**„Degradarea biologică a ligninei este unul dintre componentele cele mai importante ale circuitului carbonului și oxigenului în biosferă..."**

D. L. Crawford
R. L. Crawford

Lignina este cel mai abundent material aromatic reînnoibil și, după celuloză, al doilea material organic în natură. Ea aduce în fiecare an pe sol cantități imense de C organic, greu degradabil sub acțiunea microorganismelor. Este prezentă la toate plantele verzi, inclusiv la ferigi, și absentă la cele care nu au traheide (cum sînt briofitele și alte plante cu rang taxonomic inferior).

Studiile referitoare la distribuția ligninei în straturile pereților celulari complet lignificați de la molid au arătat că, în medie, concentrația ligninei în lamela mijlocie este de două ori mai mare decît în peretele secundar. Cu toate acestea, întrucît volumul peretelui secundar este mult mai mare, cea mai mare parte din lignina totală (70—80%) este localizată la nivelul său. Restul (20—30%) este prezentă în lamela mijlocie. În peretele celular, lignina, împreună cu hemicelulozele, formează o matrice care înconjură microfibrilele ordonate de celuloză, reprezentînd o barieră fizică redutabilă de rezistență la degradarea acestora.

Mai abundentă la plantele lemnoase și în structurile lignificate, lignina asigură rigiditatea, ductilitatea și rezistența la stresul mecanic (gravitație, ploi, vînt etc.) ale acestora.

După Higuchi (1971), ea reprezintă 20—30% din greutatea uscată a lemnului matur și numai 3—6% din cea a plantelor ierboase.

### Arhitectura moleculară a ligninei

Lignina reprezintă grupul molecular cel mai complex și mai puțin caracterizat din structura țesuturilor vegetale. Este un compus cu structură neuniformă, în sensul că ligninele provenite de la diferite plante (ierboase, lemnoase de esență tare sau moale) diferă chimic unele de altele. Ceva mai mult, chiar la aceeași specie au fost înregistrate diferențe în structura chimică a ligninei, în mare măsură corelate cu gradul de maturitate a plantelor. Această particularitate explică de ce s-au propus mai multe modele de structură, avînd unele detalii încă neclarificate.

Lignina este un polimer aromatic tridimensional, insolubil în apă, alcătuit din unități fenil-propan, rezultat prin cuplarea aleatorie a trei tipuri de alcooli precursori:

1) *Alcoolul p-cumarilic* (p-hidroxicinamil), care formează în polimer unități de p-hidroxifenil;

2) *Alcoolul coniferilic* (4-hidroxi-3-metoxicinamil), care formează unități guaiacil;

3) *Alcoolul sinapilic* (3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamil), care formează în polimer unități de siringil (fig. 313).

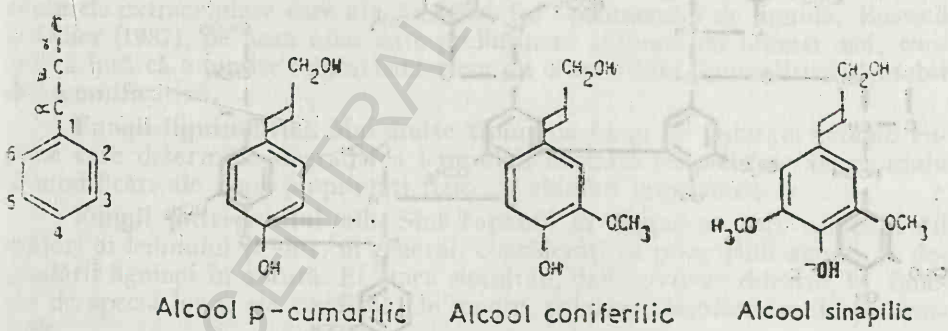



Fig. 313. — Formulele chimice ale alcoolilor precursori ai ligninei și nomenclatura atomilor de carbon din structura lor.

Co-polimerizarea relativ aleatorie a acestor alcooli determină formarea unui polimer heterogen, optic inactiv, interconectat și înalt polidispers cu o mare heterogenitate de structură și rezistență la degradare (Kerr și Farrell, 1987) în care unitățile de bază sînt menținute asociat prin diferite tipuri de legături carbon — carbon sau aril — eter. Cei trei monomeri precursori sînt prezenți în proporții variabile în funcție de specia plantei, de tipul de țesut, de localizarea ligninei în peretele celulei vegetale și de fotoperioadă (Buswell și Odie, 1987) (fig. 314). Lignina gimnospermelor (lignina guaiacil) conține predominant structuri de tip coniferil, în timp ce lignina angiospermelor

(lignina guaiacil-siringil) este formată din cantități aproximativ egale de unități coniferil și sinapil și cantități mai mici de unități de alcool p-cumarilic. Ligninele plantelor ierboase conțin un amestec al celor trei alcooli monomeri, cu cantități relativ mari de structuri de tip p-cumaril și, în plus, cu unități de acid ferulic și p-cumaric unite prin legături ester.

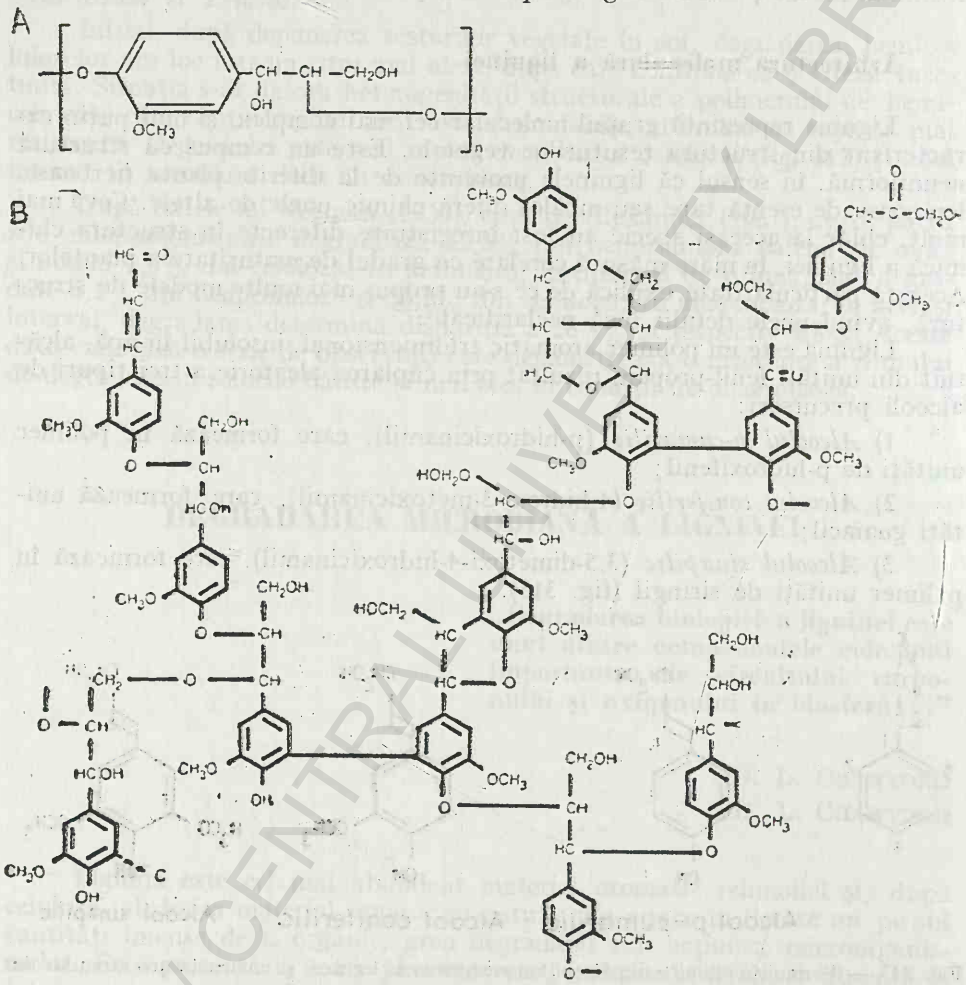



Fig. 314. — Model general de structură a unui polimer de lignină (B). Subunitatea fenilpropan (A) este asociată prin legături C—C și eter într-un complex cu structură tridimensională, relativ rezistent la degradare, și care în „complexul ligninocelulozic" al lemnului încetinește și biodegradarea celulozei (după Atlas și Bartha, 1987).

## MICROORGANISMELE CARE DEGRADEAZĂ LIGNINA

Lignina este degradată de fungi și de bacterii. Chiar în cazul unor forme de viață mai evoluate, cum sînt termitele și alte insecte xilofage, recunoscute ca apte să digere lignina, această capacitate este conferită de anumite populații din microbiota lor intestinală (French și Bland, 1975).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Datorită dimensiunilor mari ale polimerilor de lignină (600—1000 kdal) și particularităților lor structurale, sistemele enzimatice microbiene care determină primul atac trebuie să fie extracelulare, nespecifice și nehidrolitice (Kirk și Farrell, 1987). Foarte multe microorganisme produc numai degradări incomplete, deoarece nu dispun de întreg setul de enzime necesare pentru a ataca toți componenții structurali ai ligninelor (Crawford și Crawford, 1980).

**Bacteriile.** Mai multe specii de bacterii aerobe, inclusiv unele actinomicete, degradează lignoceluloza și, probabil, fragmentele derivate din activități abiotice sau din acțiunea altor microorganisme. Printre acestea au fost semnalate ca avînd o activitate puțin marcată: *Pseudomonas fluorescens, P. acidovorans* și, în anumite faze ale procesului de degradare, *Acinetobacter, Aeromonas, Arthrobacter* sp., *Bacillus, Flavobacterium, Micrococcus, Xanthomonas* etc. (Vicuna și colab., 1987).

Dintre **actinomicete**, *Streptomyces viridosporus, S. flavovirens* și *S. setonii* produc, prin alterări oxidative asemănătoare celor induse de fungi, pierderi în greutate cuprinse între 33 și 44 % din lemnul de molid sau de arțar.

Speciile de *Streptomyces* menționate, precum și *Nocardia autotrophica* convertesc în interval de două săptămîni la $^{14}CO_2$ peste 8 % din greutatea ligninei de la angiosperme, marcată cu $^{14}C$. Nilsson și Daniel (1985) au demonstrat că bacteriile care degradează lemnul produc diferite tipuri de leziuni, pătrunzînd fibrele, inclusiv lamela mijlocie, și determinînd pierderi importante în greutatea lemnului. Unele („Erosion bacteria") degradează celulele lemnului din lumen, în timp ce altele („Tunneling and cavitation bacteria") pătrund în peretele celular al fibrei „săpîndu-l".

În general, se consideră că acțiunea ligninolitică a bacteriilor este moderată și niciodată rapidă sau extensivă. Nu se știe sigur dacă bacteriile au enzimele extracelulare care atacă „scheletul" polimerului de lignină. Buswell și Odier (1987), pe baza unor date preliminare obținute cu tehnici noi, consideră însă că anumite tulpini bacteriene au o activitate ligninolitică deosebit de semnificativă.

**Fungii ligninolitici.** Mai multe tipuri de fungi de putregai produc enzime care determină degradarea lemnului, asociată cu pierdere în greutate și modificări ale unor proprietăți fizice și chimice importante.

**Fungii putregaiului alb.** Sînt capabili să degradeze toți componenții majori ai lemnului și sînt, în general, considerați ca principalii agenți ai degradării ligninei în natură. Ei atacă simultan, dar cu viteze diferite, în funcție de specia lor și de condițiile de mediu, celuloza, hemicelulozele și ligninele.

Sînt în număr de cîteva sute și formează un grup heterogen, reprezentat în special de: *Basidiomycetes*, aparținînd unui număr de familii din *Hymenomycetes* (ca, de exemplu, *Agaricaceae, Corticiaceae, Hydnaceae, Polyporaceae* și *Telephoraceae*). Se adaugă cîteva *Ascomycetes* din ordinul *Sphaeriales* (*Ustilina vulgaris, Xylaria polymorpha* ș.a.).

Cel mai mult studiat este *Phanerochaete chrysosporium* = *Sporotrichum pulverulentum* care invadează lumenul celulelor lemnului, secretînd enzime care degradează lignina și alți constituenți din structura acestuia. Atacul seamănă inițial cu cel al putregaiului brun dar, spre deosebire de acesta, continuă pînă la degradarea componenților majori ai lemnului la $CO_2$ și $H_2O$. Pe măsură ce atacă lemnul, degradează simultan atît lignina, cît și polizaharidele (celuloza etc.).

După Atlas și Bartha (1987), marea eficiență a fungilor putregaiului alb este determinată, cel puțin în parte, de capacitatea lor de a produce o serie de agenți oxidanți ca $H_2O_2$, anionul superoxid ($O_2^-$), radicalul hidroxil (—OH), oxigenul singlet ($^1O_2$), care rup legăturile dintre subunitățile componente ale lignineI, producînd depolimerizarea acesteia.

Într-un studiu experimental, Young, Effland și Kirk (1980) au demonstrat că 1 g de miceliu fungic poate degrada 200 mg lignină/zi. Lucrînd cu lignină din paiele de grîu, Ulmer și colab. (1983) au evidențiat o activitate de trei ori mai mare.

Activitatea ligninazică a fost semnalată și la alți fungi de putregai alb ca: *Phlebia radiata, Panus tigrinus, Coriolus versicolor, Poria subacida, Polyporus anceps, P. abientinus, Lentinula edodes, Pleurotus ostreatus, Bjerkandera adusta* (Kirk și Farrell, 1987).

Unele specii fungice ca, de exemplu, *Xylaria, Libertella, Hypoxylon* etc. atacă preferențial lignina de la angiosperme, nu însă și pe cea din gimnosperme.

**Fungii putregaiului moale**, reprezentați de unele specii de *Ascomycetes* și de *Fungi imperfecti*, atacă lemnul extensiv în condiții de mare umiditate.

Ei străbat peretele secundar al celulei lemnului și formează cavități cilindrice în care se dezvoltă hifele. Leziunile determină o „înmuiere" a țesutului lemnos cu pierderi importante în greutate.

Dintre fungii cu activitate ligninazică marcată sînt de menționat: *Chaetomium globosum, C. piluliferum, Cephalosporium, Allecheria, Graphium, Monodictys, Poecylomyces, Papulosporum, Monodictys, Thielaria, Preussia, Stachybotrys* etc. (Crawford și Crawford, 1980). *Poecylomyces* și *Allescheria* degradează mai repede lignina decît celuloza. Celelalte au o acțiune inversă. *Chaetomium piluliferum*, spre exemplu, degradează în 50 de zile 20—30% din lignina sintetică marcată cu $^{14}C$ expusă acțiunii lor.

În general, se consideră că fungii putregaiului moale nu sînt foarte activ ligninolitici. Ei pot avea, totuși, o importanță deosebită pe plan global, datorită abundenței lor în sol și cantităților mari de resturi lignocelulozice.

**Fungii putregaiului brun** atacă preferențial celuloza și hemicelulozele, în timp ce lignina, ale cărei resturi rezultate din degradare sînt colorate în brun, este modificată chimic și descompusă mai slab (Higuchi, 1971). Ei invadează lumenul celulelor lemnului, secretă enzime și degradează celuloza și hemiceluloza dinspre interior. Procesul de degradare este, în mare măsură, limitat la straturile $S_1$ și $S_2$ ale peretelui secundar, care sînt mai puțin lignificate. Peretele primar și lamela mijlocie sînt rezistente la atac probabil datorită conținutului ridicat în lignină (Buswell și Odier, 1987).

Dintre speciile mai active, Crawford și Crawford (1980) citează: *Poria monticola*, care degradează , în special, lemnul de molid, *P. cocos, Lentinus, Polyporus* și *Lenzitestrabea* (sin. *Glocophyllum trabeum*).

### Biochimia degradării enzimatice a lignineI

Corespunzător structurii complexe a ligninelor, reacțiile de degradare sînt foarte complexe și implică o mare diversitate de reacții și de produși, precum și cîteva enzime esențiale pentru declanșarea acestui proces.

**Ligninaza** *(Ligninperoxidaza)*, enzima-cheie a ligninolizei, a fost descoperită simultan de Kirk și Tien (1983) și de Gold și colab. (1983), în lichi-

dul culturii de *Phanerochaete chrysosporium*. A fost detectată ulterior la mai mulți fungi ca: *Phlebia radiata, Panus tigrinus, Coriolus versicolor, Pleurotus ostreatus* și *Bjerkandera adusta*.

Este o oxireductază cu g.m. 41—42 kdal, care conține hem. Tien și Kirk (1984) au definit-o ca o oxigenază care necesită $H_2O_2$. În prezența $H_2O_2$, ligninaza catalizează oxidarea ligninei și a compușilor înrudiți cu ea, cu producere de radicali cationici. Are o specificitate foarte limitată, fapt care îi permite să se lege pe structura neregulată a substratului natural (Hammel, Kalyanaraman și Kirk, 1987).

**Mn-peroxidaza**, enzimă diferită de ligninază, este, de asemenea, prezentă în lichidul de creștere al fungilor de putregai alb *(P. chrysosporium)*. Funcționează ca o enzimă care oxidează fenolii și participă, probabil, la producerea de $H_2O_2$.

**Fenoloxidazele** sînt enzime extracelulare produse, adesea, în cantități mari de cei mai mulți fungi de putregai alb. Sînt reprezentate de *laccază* (p-difenoloxigen oxidoreductază) și peroxidază (donor: $H_2O_2$ oxidoreductază). Deși asociate funcțional cu biodegradarea ligninei, rolul lor este încă neclar. Inițial li s-a atribuit funcția de îndepărtare a electronilor din substructurile ligninei (respectiv din substratul fenolic), realizînd, prin aceasta, mecanismul primar de atac al polimerului. Ulterior însă, s-a demonstrat că biodegradarea ligninei are loc pe anumite căi care nu implică structurile fenolice.

Tien și Kirk (1984) consideră că lignin-peroxidazele de la *P. chrysosporium* au, pe lîngă capacitatea de a cataliza oxidarea fenolilor, și pe cea de a ataca substratele nefenolice (Kirk și Farrell, 1987; Buswell și Odier, 1987).

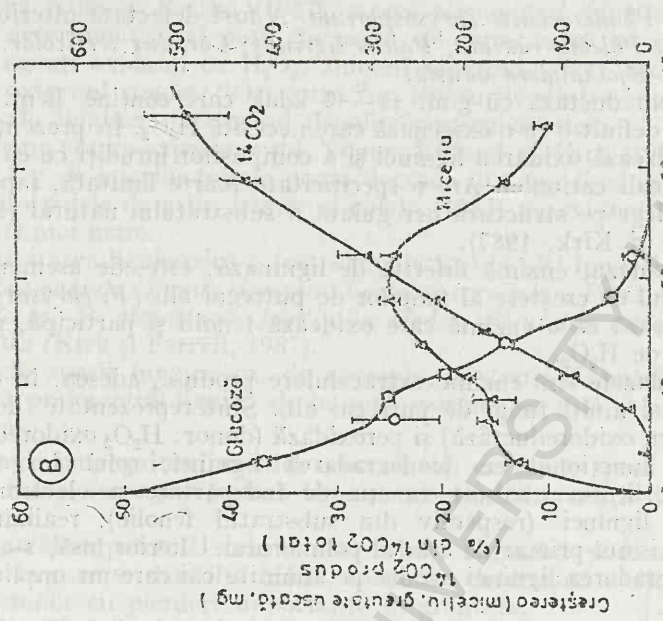
**Condițiile de degradare.** Studiile experimentale au precizat condițiile biodegradării și principalele faze ale acestui proces, furnizînd date extrapolabile și în natură.

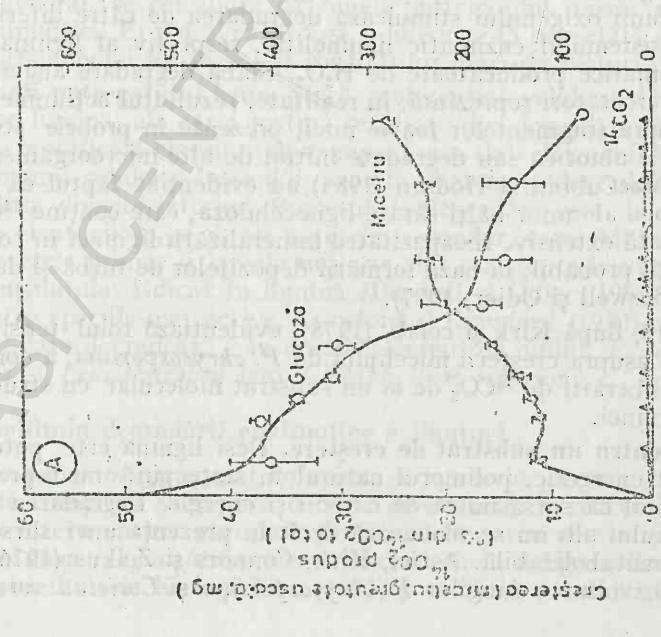
**Rolul oxigenului.** Descompunerea ligninei este un proces oxidativ. Creșterea tensiunii oxigenului stimulează degradarea de către diferiți fungi, mărind titrul sistemului enzimatic ligninolitic, respectiv al ligninazei și al sistemelor enzimatice producătoare de $H_2O_2$. Slaba degradare anaerobă descrisă de unii cercetători reprezintă, în realitate, rezultatul acțiunii enzimelor microbiene asupra fragmentelor foarte mici, prezente în probele studiate și eliberate pe cale abiotică sau degradate inițial de alte microorganisme.

Benner, MacCubbin și Hodson (1984) au evidențiat faptul că în sedimentele anaerobe ale unor bălți sărate lignoceluloza, care conține $^{14}C$-lignină nu este degradată extensiv. Incapacitatea mineralizării ligninei în condiții de anaerobioză stă, probabil, la baza formării depozitelor de turbă și de cărbuni ale biosferei (Buswell și Odier, 1987).

Figura 315, după Kirk și colab. (1978), evidențiază rolul tensiunii parțiale de oxigen asupra creșterii miceliului de *P. chrysosporium*, a consumului de glucoză și eliberării de $^{14}CO_2$ de la un substrat molecular cu structură caracteristică ligninei.

**Nevoia pentru un substrat de creștere.** Deși lignina este potențial un material bogat energetic, polimerul natural în stare pură nu reprezintă un substrat accesibil ca sursă unică de carbon și energie. Degradarea de către fungii putregaiului alb nu se realizează decît în prezența unei surse de carbon mai ușor metabolizabilă. Astfel, Kirk, Connors și Zeikus (1976) au demonstrat că dezvoltarea fungilor *P. chrysosporium* și *Coriolus versicolor* pe




BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

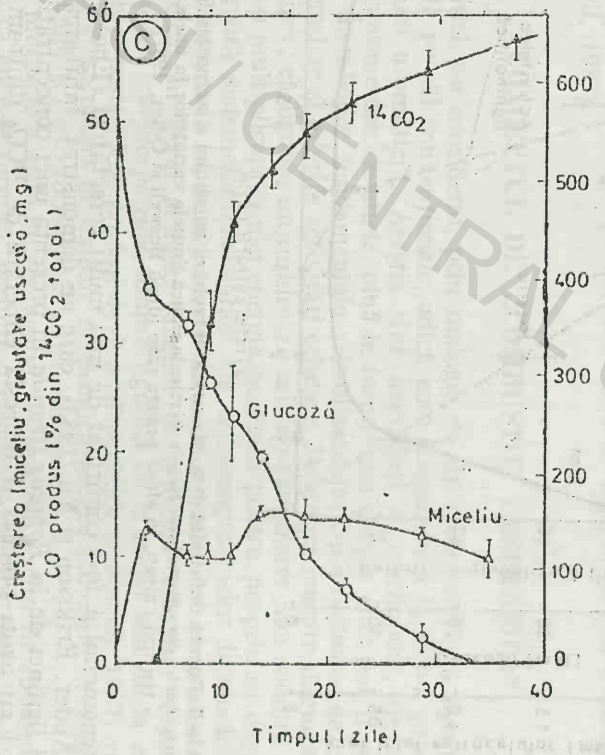



Fig. 315. — Efectul presiunii parțiale a oxigenului asupra creșterii (greutatea miceliului uscat), consumului glucozei și producerii de $CO_2$ de la ciclul C—DHP (*de*hidro*po*limerizat) de către *Phanerochaete chrysosporium*. **A.** $pO_2$ = 0,05 atm. **B.** $pO_2$=0,21 atm. **C.** $O_2$ = 1 atm=(după Lorenz și Zeikus, 1977).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lignina de la molid marcată radioactiv este neglijabilă și că degradarea la $^{14}CO_2$ necesită prezența unui substrat pentru creștere ca glucoză sau celuloză. Deoarece lignina este o moleculă foarte stabilă, probabil, co-substratul furnizează energia necesară pentru sinteza enzimelor degradative, pentru producerea $H_2O_2$ (asociată cu activitatea unora dintre acestea) și pentru sinteza unor efectori posibili ai sistemului ligninolitic. Viteza și gradul degradării sînt proporționale cu concentrația de celuloză adăugată. După epuizarea acesteia, descompunerea ligninei încetează.

În condiții naturale, degradarea ligninei este asociată cu co-metabolismul celulozei, al hemicelulozelor și al mai multor substanțe glucidice.

**Influența azotului.** Limitarea nutrienților cu azot are un rol major în sinteza și activitatea sistemului enzimatic ce degradează lignina de la *P. chrysosporium* (Kirk și colab., 1978). Ea stimulează creșterea micelială și activitatea ligninolitică (Keiser, Kirk și Zeikus, 1978) (fig. 316).

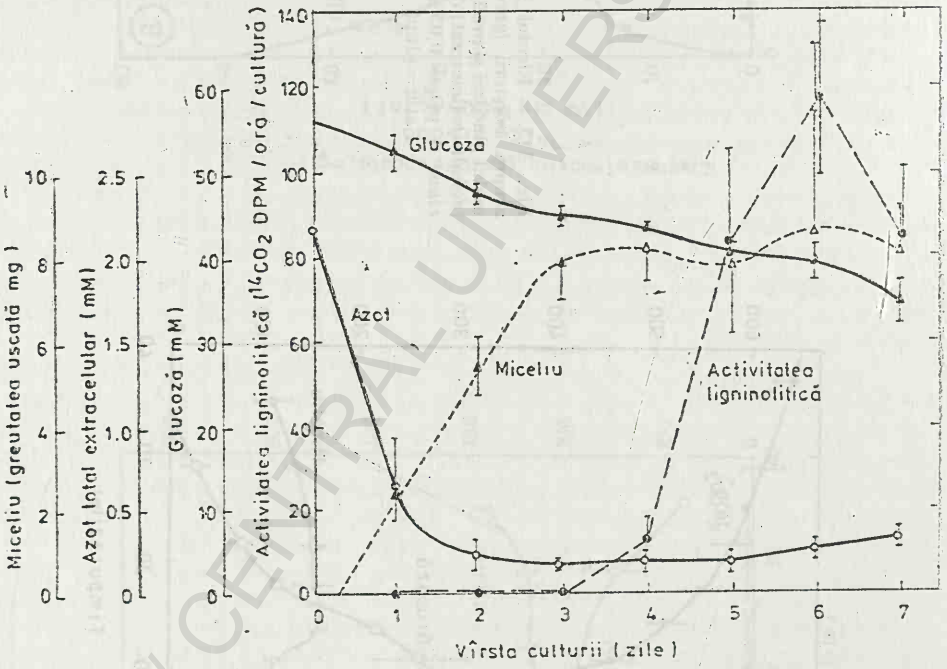



Fig. 316. — Influența deficitului de azot asupra dezvoltării miceliului și activității ligninolitice la *Phanerochaete chrysosporium*. Barele verticale indică limitele variațiilor în unele cazuri pentru trei culturi, în altele pentru șase (după Buswell și Odier, 1987).

Fenomenul a fost confirmat de mai mulți cercetători (Enoki și colab., 1980; Ander, Eriksson și Yu, 1983), care au demonstrat inhibarea descompunerii ligninei de la *Populus tremula* în prezența unei concentrații mari de compuși cu azot, precum și represia eliberării de $^{14}CO_2$ dintr-un compus-model de structură a ligninei marcat radioactiv.

Deși au fost descriși și fungi areactivi la concentrația azotului sau cu reacție slabă față de „efectul N" *(Pholiota mutabilis)*, precum și fungi mai activi la concentrații crescute de N, ei reprezintă, în realitate, excepții rare.

Activitatea ligninolitică (cu producere de $^{14}CO_2$) a fost testată pe o lignină polimerică sintetică obținută prin polimerizarea alcoolului coniferilic și denumită DHP (*de*hidro*p*olimerizat) marcată radioactiv cu $^{14}C$. S-a demonstrat că adăugarea de $NH_4^+$ sau de aminoacizi (L-glutamat, glutamină, histidină), ca și a diferite surse complexe de N inhibă legarea miceliului de substrat și depolimerizarea ligninei sintetice, întîrziind foarte mult acțiunea enzimelor degradative. După date mai recente, bazate pe studiul moleculelor de ARNm de la *P. chrysosporium* izolate din fazele de creștere ligninolitice și neligninolitice, rezultă că efectul supresor al compușilor cu azot din mediu acționează, cel puțin în parte, asupra ratei de sinteză a ARN (Fenn, Choi și Kirk, 1981; Buswell și Odier, 1987).

În afara acestor condiții majore, ligninoliza necesită anumite condiții de pH, concentrații adecvate de săruri minerale și de microelemente. Ligninoliza implică intervenția unor reacții oxidative (demetilări, hidroxilări), clivări de cicluri aromatice, care au drept rezultat producerea unei game largi de fragmente, cu greutate moleculară mică (predominant cu g.m. $< 1$ kdal) și un număr mare de produși rezultați din depolimerizare (Leisola și colab., 1983; Faix și colab., 1985). Unii dintre aceștia (fenoli, acizi aromatici, alcooli aromatici etc.) sînt degradați, prin mineralizare, la $CO_2$ și $H_2O$. Alții sînt preluați și convertiți în compuși ai humusului, adică sînt repolimerizați, în parte spontan și în parte sub acțiunea unor enzime microbiene (polifenoloxidaze, peroxidaze, laccaze etc.). În felul acesta, se realizează o detoxificare a mediului, împiedicîndu-se acumularea intermediarilor fenolici nocivi.

Figura 317 ilustrează complexitatea reacțiilor determinate de ligninază/$H_2O_2$ ce acționează asupra ciclului A sau B din structura unor molecule-model cu producerea a 14 produși intermediari care au fost identificați (Kirk și Farrell, 1987).

## CONCEPTUL DE „COMBUSTIE ENZIMATICĂ"

Inițial, s-a considerat, prin analogie cu alți biopolimeri, că lignina este degradată pe căi convenționale, adică este fragmentată la cîțiva produși — „monomeri aromatici". Aceștia sînt degradați în continuare, de aceleași microorganisme sau de altele, pînă la forme mai simple care pot fi preluate de căile metabolice fundamentale și utilizate pentru producere de energie, pentru creștere și diferite activități celulare. Date mai recente demonstrează, fără echivoc, că lignina nu furnizează microorganismelor nici condiții pentru creștere și multiplicare și nici energia necesară pentru propria sa degradare.

Expusă sistemelor enzimatice ale microorganismelor ligninolitice, ea este descompusă la un număr foarte mare de intermediari cu greutate moleculară mică. În cazul acțiunii fungilor de putregai alb, ca, de exemplu, *Phanerochaete chrysosporium*, asupra ligninei de la molid sau de la mesteacăn se obțin peste 75 de produși de degradare. Kirk și Farrell (1987) remarcă faptul că acest proces de oxidare nespecifică prezintă anumite analogii (evident incomplete) cu procesele de ardere în general.

În procesele uzuale de combustie, energia din legăturile covalente este eliberată ca energie termică, permițînd clivarea extensivă homolitică și producerea unor compuși care conțin radicali volatili. Fenomenul este prezent într-o formă evident atenuată în degradarea ligninei sub acțiunea fungilor putregaiului alb, care produc clivări homolitice.

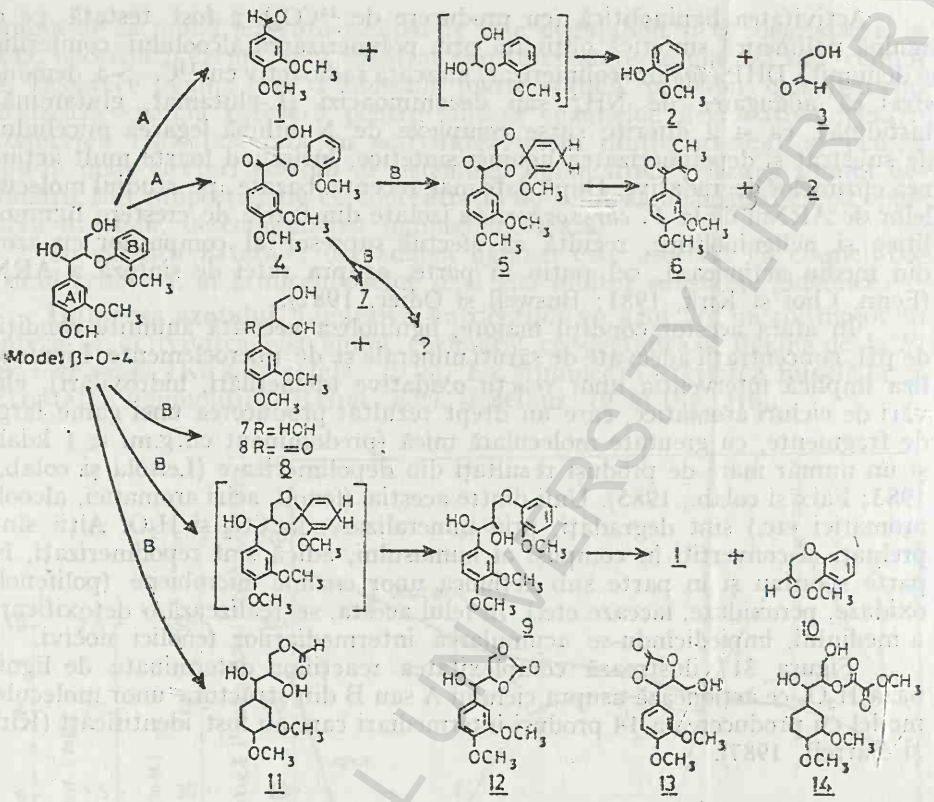



Fig. 317. — Produşii de oxidare ai compuşilor cu structura β-O-4 sub acţiunea ligninazei/$H_2O_2$. Oxidarea poate avea loc la nivelul ciclurilor A sau B (după Kirk şi Farrell, 1987).

Mărimea, complexitatea moleculară şi heterogenitatea de structură ale ligninei impun ca biodegradarea iniţială să fie oxidativă, nespecifică şi mediată de enzime extracelulare. Procesul este deosebit de biodegradările convenţionale efectuate de sistemele biologice, în care reacţiile catalizate enzimatic (ca, de exemplu, oxidarea catalizată de oxigenaze sau de dehidrogenaze specifice) evoluează cu o mare specificitate. În etapele iniţiale ale depolimerizării ligninei, fungii acţionează tot pe cale enzimatică, dar cu o extraordinară lipsă de specificitate. Ea duce la apariţia unui număr enorm de produşi şi a unei pletore de reacţii enzimatice divergente, nedepăşite şi neegalate de nici un alt sistem enzimatic. Diversitatea reacţiilor care determină degradarea la $CO_2$ a produşilor astfel rezultaţi ţine de structura lor chimică. Pe aceste criterii, Kirk (1987) consideră că procesul de oxidare secvenţială nespecifică a ligninei poate fi caracterizat cel mai bine ca un proces de *combustie enzimatică*, respectiv ca o modalitate unică de degradare prin „ardere" catalizată de enzime nespecifice.

Procesul ar putea fi mai larg răspîndit în natură, unde ar asigura degradarea multor complexe enzimatice, ca şi a unor produşi obţinuţi integral sau parţial pe cale abiotică. Oricum, el are o importanţă majoră în circuitul carbonului în biosferă.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

## CHITINA ȘI MICROORGANISMELE CHITINOLITICE

Chitina este un polimer de N-acetil glucozamină cu structură de ansamblu asemănătoare celulozei, de care se deosebește prin prezența N în structura sa (Okafor, 1966). Are formula chimică globală $(C_6H_9O_4 \cdot NH—CO—CH_3)_n$. În stare pură conține 6,9% N. Este formată dintr-un lanț lung de unități de N-acetil glucozamină, dispuse într-un aranjament linear (fig. 318).

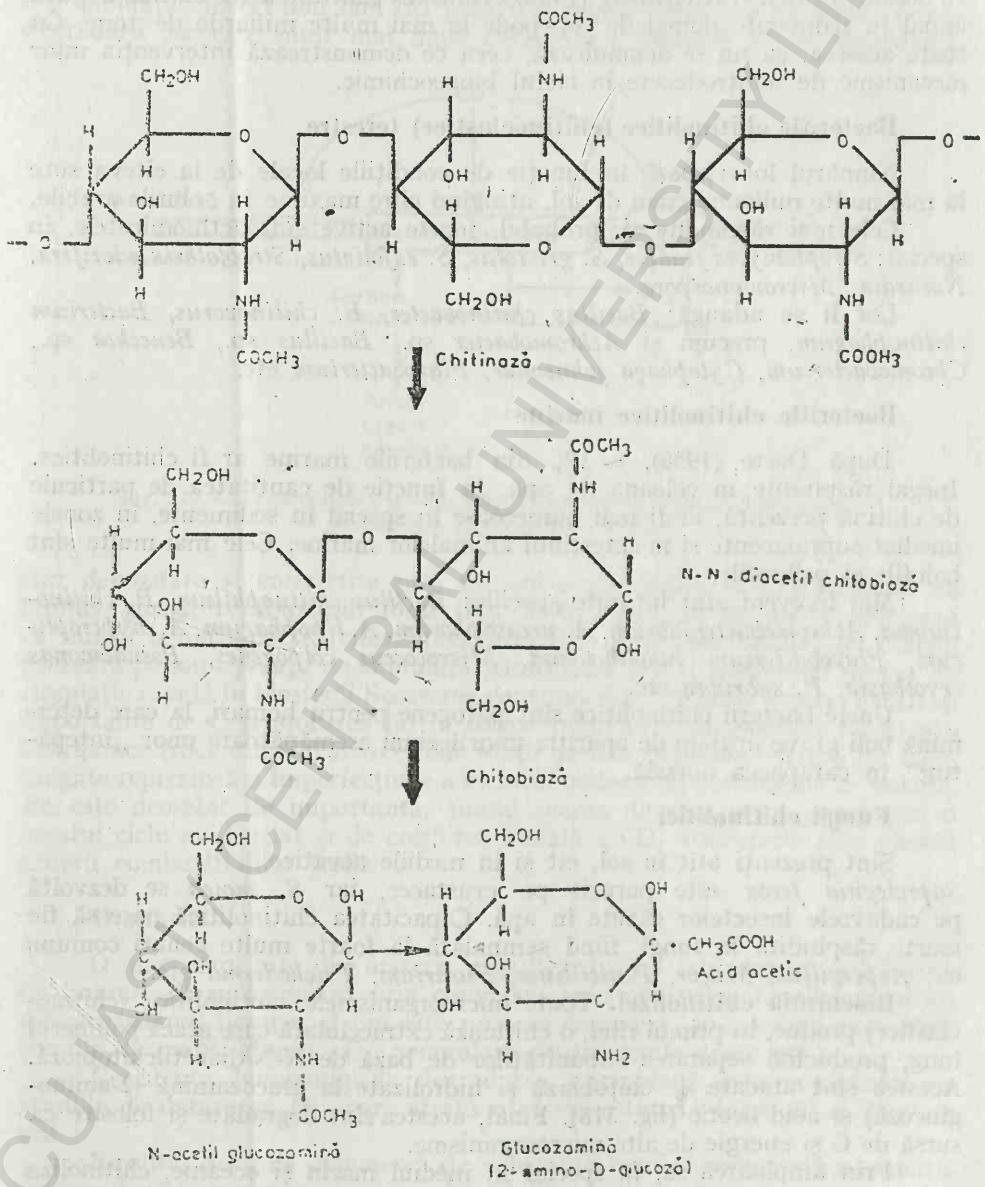



Fig. 318.—Structura chimică a chitinei și căile de degradare sub acțiunea enzimelor microbiene.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este insolubilă în apă, în solvenți organici și alcali concentrați. Poate fi solubilizată enzimatic sau cu acizi minerali concentrați.

Este prezentă în peretele celular al fungilor (2,6—26,0%, raportat la greutatea lor uscată), la unele alge verzi, precum și la nematode, anelide (polichete și oligochete), moluște (cefalopode și gasteropode), celenterate, artropode și în cantități mici în chiștii unor protozoare.

Chitina din sol provine din resturile artropodelor hipogee și ale fungilor. În oceane, ZoBell și Rittenberg (1938) evaluează cantitatea de chitină depusă anual în sedimente numai de copepode la mai multe miliarde de tone. Cu toate acestea, ea nu se acumulează, ceea ce demonstrează intervenția unor mecanisme de reintroducere în ciclul biogeochimic.

### Bacteriile chitinolitice (chitinoclastice) terestre

Numărul lor variază în funcție de condițiile locale de la cîteva sute la mai multe milioane/gram de sol, atingînd cifre maxime în solurile arabile.

Cele mai răspîndite și, probabil, foarte active sînt actinomicetele, în special: *Streptomyces fradiae, S. griseolus, S. exfoliatus, Streptothrix odorifera, Nocardia, Micromonospora.*

Lor li se adaugă: *Bacillus chitinobacter, B. chitinovorus, Bacterium chitinophagum,* precum și *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Beneckea* sp., *Chromobacterium, Cytophaga johnsonae, Flavobacterium* etc.

### Bacteriile chitinolitice marine

După Daste (1956), ~ 1% din bacteriile marine ar fi chitinolitice. Inegal răspîndite în coloana de apă, în funcție de cantitatea de particule de chitină prezentă, ar fi mai numeroase în special în sedimente, în zonele imediat supraiacente și în intestinul animalelor marine. Cele mai multe sînt halofile și psihrofile.

Mai frecvent sînt întîlnite speciile: *Bacillus chitinophilum, B. chitinochroma, Achromobacter labrum, A. urcasophorum, A. lipophagum, A. hyperopticum, Flavobacterium indoltheticum, Micrococcus colpogenes, Pseudomonas cryothasia, P. subrubra* etc.

Unele bacterii chitinolitice sînt patogene pentru homari, la care determină boli grave inițiate de apariția unor leziuni asemănătoare unor „înțepături" în carapacea dorsală.

### Fungii chitinolitici

Sînt prezenți atît în sol, cît și în mediile acvatice.

*Saprolegnia ferox* este parazit pe crustacee, iar *S. moica* se dezvoltă pe cadavrele insectelor căzute în apă. Capacitatea chitinolitică pare să fie foarte răspîndită la fungi, fiind semnalată la foarte multe genuri comune ca: *Aspergillus, Mucor, Penicillium, Fusarium, Trichoderma* etc.

**Biochimia chitinolizei.** Toate microorganismele chitinolitice (chitinoclastice) produc, în primul rînd, o chitinază extracelulară care atacă polimerul lung, producînd separarea subunităților de bază de N-N-diacetilchitobioză. Acestea sînt atacate de chitobiază și hidrolizate la glucozamină (2-aminoglucoză) și acid acetic (fig. 318). Final, acestea sînt degradate și folosite ca sursă de C și energie de alte microorganisme.

Prin amploarea sa, în special în mediul marin și oceanic, chitinolizarea are o anumită semnificație în ciclul biogeochimic al carbonului.

## SCOATEREA DIN CIRCULAȚIE A CARBONULUI ORGANIC SAU ANORGANIC

În funcție de structura lor moleculară, unele substanțe organice sînt degradate și mineralizate rapid și reintroduse în circuitul biogeochimic, în timp ce altele, mai rezistente sau chiar „recalcitrante", sînt practic scoase din circulație, în cel mai bun caz pentru perioade foarte îndelungate. Viteza degradării lor este mult mai mică decît cea a formării și, în consecință,

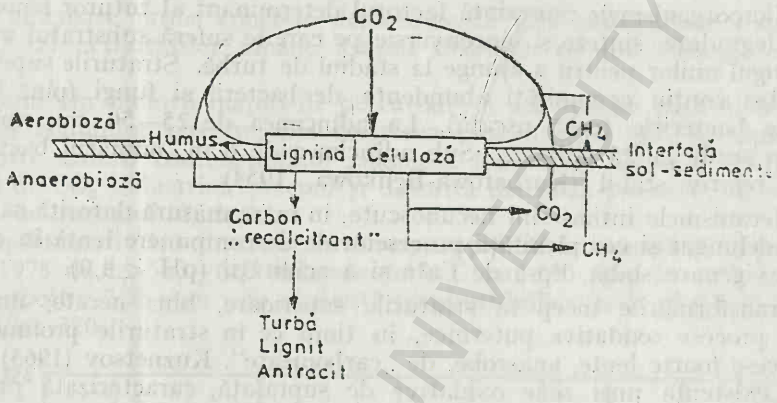



Fig. 319. — Consecințele degradării lignocelulozei de către microorganisme în ecosferă (după Zeikus, 1983).

sînt depozitate și convertite prin mecanisme biologice și fizicochimice ca humus, turbă, combustibili fosili (fig. 319). Bolin (1970, 1979) apreciază că numai o mică parte (cîteva procente) din cantitatea imensă de carbon prezentă *pe* sau *aproape* de suprafața pămîntului este expusă unui proces de circulație rapidă în biosferă. Scoaterea continuă din circulație a unor cantități importante de C și stocarea lui în forme organice (combustibili fosili) sau anorganice (roci calcare) inaccesibile vieții pentru perioade extrem de îndelungate reprezintă o imperfecțiune a ciclului biologic al carbonului în natură. Ea este deosebit de importantă, ținînd seama de caracterul particular al acestui ciclu evidențiat și de creșterea anuală a $CO_2$ atmosferic prin efectul arderii combustibililor fosili.

### Humusul

O mare cantitate din materia organică din sol este depusă sub formă de humus. El se formează prin conversia intermediarilor fenolici rezultați din degradarea ligninei și din alte procese complexe, în condiții favorabile (umiditate mare, absența $O_2$, acumulare de substanțe acide etc.).

Rezistența humusului la degradarea microbiană este confirmată de studiile de datare cu $^{14}C$, care atestă o vîrstă estimată între 20 și 2000 de ani.

Rezultă, deci, că depunerea de substanțe humice reprezintă o situație intermediară în raport cu cea a combustibililor fosili (a căror formare necesită

zeci și sute de milioane de ani) și, în același timp, o situație intermediară între procesele de degradare și reciclare și cele de depozitare ca substanțe sechestrate în zăcăminte din sol.

### Turba

O modalitate oarecum asemănătoare de scoatere din circulație este întîlnită în cazul turbei formate în unele mlaștini eutrofizate, în care condițiile de degradare a materiei organice sînt reduse.

Microorganismele reprezintă factorul determinant al tuturor fenomenelor de degradare, sinteze și bioconversie pe care le suferă substratul vegetal de-a lungul anilor pentru a ajunge la stadiul de turbă. Straturile superioare ale turbei conțin comunități abundente de bacterii și fungi (pînă la 700 milioane bacterii/g turbă uscată). La adîncimea de 25—50 cm, numărul acestora scade la 25 milioane. Sub adîncimea de 6 m, numărul bacteriilor devine relativ stabil (Kurbatowa-Belikowa, 1954).

Mecanismele intime sînt necunoscute, în mare măsură datorită caracterului îndelungat și complexității proceselor de descompunere lentă în condiții de oxigenare slabă, lipsă de $Ca^{2+}$ și a acidității (pH < 4,0).

Transformările încep în straturile superioare, bine aerate, unde se produc procese oxidative puternice, în timp ce în straturile profunde au loc procese foarte lente, anaerobe, de „carbonizare". Kuznețsov (1963) recunoaște existența unei zone oxidative de suprafață, caracterizată printr-o activitate intensă a microorganismelor, o zonă intermediară, care poate fi oxidativă sau reducătoare, în funcție de umiditate și de condițiile climatice, și o zonă profundă, predominant reducătoare, cu o activitate microbiană foarte redusă.

Turba este un mediu biologic al cărei conținut în microorganisme diferă în funcție de natura substanțelor organice și de perioada de evoluție. În general predomină microorganismele anaerobe, acidofile, rezistente la presiuni ridicate, care se adaptează greu la creșterea pe medii artificiale *in vitro* și care, adesea, încetează să se dezvolte în subculturi.

### Depozitele de carbon anorganice

Acestea se produc prin precipitarea carbonatului de calciu rezultat din combinarea acidului carbonic dizolvat în apa de mare cu $Ca^{2+}$ în condiții slab alcaline. Un rol important revine „depozitării biologice" în cazul foraminiferelor, moluștelor, coralilor etc.

Depunerea de roci calcaroase semnificativă din punct de vedere geologic reduce cantitatea de C disponibil pentru sistemele biologice. Carbonul imobilizat nu este accesibil microorganismelor pentru a fi introdus în ciclul biologic. El poate reveni în circulație în urma proceselor de eroziune sau a unei acțiuni indirecte a microorganismelor (dizolvare consecutivă modificărilor de pH). Astfel, în timp ce reducerea microbiană a sulfatului sau denitrificarea măresc alcalinitatea, favorizînd depunerile, nitrificarea, oxidarea sulfului, produșii rezultați din fermentație favorizează solubilizarea lor.

## INFLUENȚA ACTIVITĂȚILOR UMANE

**„Circuitul global al carbonului este un amestec de viteze naturale și rezervoare echilibrate și de viteze și rezervoare modificate de activitățile umane".**

R. M. ATLAS
R. BARTHA

Numeroase probe concrete demonstrează fără ambiguitate rolul perturbator al activităților umane asupra evoluției ciclului biologic al C în natură.

Unul din factorii majori de perturbare a echilibrului natural decurge, în cazul regiunilor terestre, din creșterea concentrației $CO_2$ în atmosferă, consecutiv arderii combustibililor (biomasă lemnoasă, cărbuni, țiței), producerii de $CO_2$ industrial, precum și datorită defrișării pădurilor în vederea creării de terenuri agricole.

Aproximativ 1/3 din creșterea concentrației $CO_2$ în atmosferă în perioada 1850—1978 de la 560—610 miliarde tone C sau 290 ppm la 692 miliarde tone, respectiv 320 ppm este atribuită combustibililor fosili (Bolin și colab., 1979) (fig. 320).

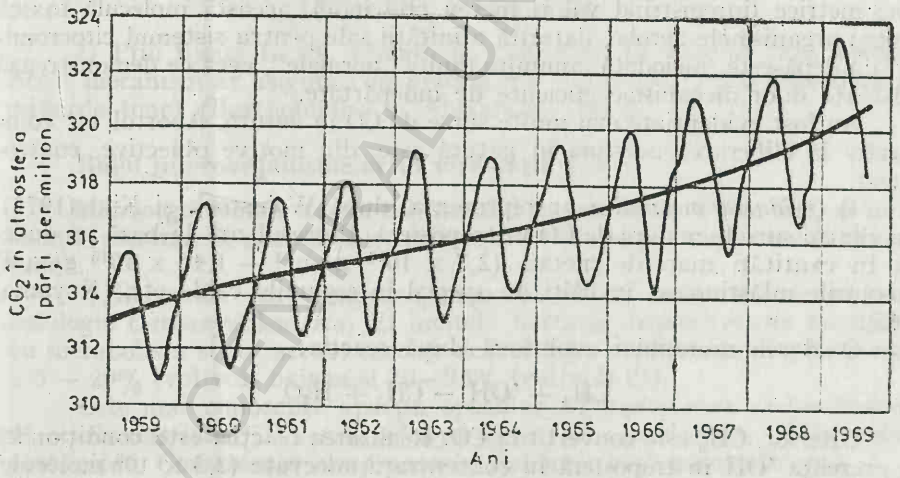



Fig. 320. — Variațiile pe termen lung ale concentrației dioxidului de carbon în atmosferă, după înregistrările Institutului Scripps de oceanografie. Curba în zig-zag reflectă variațiile sezoniere în rata fotosintezei, în timp ce linia uniformă prezintă tendința de evoluție (după Bolin, 1970).

Se apreciază că, în prezent, se înregistrează o creștere anuală cu 0,7% sau 2 ppm, care se adaugă celor 320 ppm apreciate în anul 1970 *. Aceasta ar corespunde la nivelul anului 2000 unei creșteri a concentrației $CO_2$ în

* Raportat la condițiile anului 1970, cantitatea de $CO_2$ eliberat în atmosferă din arderea combustibililor fosili a fost de 5—6 miliarde tone C/an.

atmosferă echivalentă cu 375—400 ppm. Teoretic, creșterea este mai mare, dar o parte din $CO_2$ eliberat este consumat de plante. După Bolin (1970, 1979), este probabil că, în anumite limite, arderea combustibililor fosili a fertilizat cîmpurile și pădurile. În sprijinul acestei afirmații el citează faptul că biomasa terestră a crescut în ultimul secol cu 15 miliarde de tone, precum și faptul, demonstrat experimental, de creștere mai rapidă a plantelor în atmosfera îmbogățită în $CO_2$*.

Depășirea acestor limite determină perturbări severe cu repercusiuni asupra echilibrului biologic și geochimic al ciclului.

Între efectele cele mai alarmante este de menționat *efectul de seră*, determinat de capacitatea $CO_2$ de a absorbi puternic radiațiile infraroșii ($\lambda > 780$ nm). Or, după cum se știe, radiațiile solare aparținînd spectrului vizibil sînt reflectate la suprafața pămîntului și se reîntorc în atmosferă ca radiații infraroșii (cu lungime de undă mai mare). Existența unei pături de $CO_2$ cu o concentrație mai mare decît normal va reține o cantitate mare din aceste radiații, determinînd tendința de încălzire a climei.

## CIRCULAȚIA MONOOXIDULUI DE CARBON

Microorganismele sînt implicate — alături de alte mecanisme — și în circulația CO în natură. Concentrația acestuia în atmosferă este estimată la $7{,}4 \times 10^{14}$ g. Deși producția anuală globală este apreciată la $> 5$ miliarde tone metrice (înregistrînd valori mereu crescînde), această moleculă toxică pentru organismele aerobe, datorită afinității sale pentru sistemul citocromilor, nu depășește, niciodată, anumite limite „normale", ceea ce demonstrează existența unor mecanisme eficiente de îndepărtare.

Au fost evidențiate mai multe surse de CO în natură. Aportul lor comparativ la eliberarea acestuia în natură este, din motive obiective, controversat.

1) *Oxidarea metanului* ar reprezenta, după Weinstock și Niki (1972), una dintre sursele majore de CO în troposferă. Procesul are la bază producerea în cantități mari de metan ($2{,}7 \times 10^{14}$ g/an$^{-1}$ — $1{,}45 \times 10^{15}$ g/an$^{-1}$) în solurile mlăștinoase, în bălți, în special în regiunile calde etc. (Koyama, 1963).

Oxidarea metanului evoluează după reacția:

$$CH_4 + {}^{\bullet}OH \rightarrow CH_3 + H_2O$$

Ulterior, $CH_3$ este convertit la CO. Realizarea reacției este condiționată de prezența $^{\bullet}OH$ în troposferă în concentrații adecvate ($2{,}3 \times 10^6$ molecule/cm$^3$). Weinstock și Niki (1972) apreciază cantitatea de CO produs prin oxidarea $CH_4$ la $4 \times 10^{15}$ g/an$^{-1}$ — $5 \times 10^{15}$ g/an$^{-1}$, adică aproximativ de 25 de ori mai mult decît cantitatea produsă antropogen.

2) *Oceanul* reprezintă altă sursă importantă de CO. Studiile lui Swinnerton, Linnenbon și Lamontagne (1970) au demonstrat că apele de suprafață ale Oceanului Atlantic de vest sînt suprasaturate cu CO, în comparație cu atmosfera de deasupra lor.

---

* Concentrația $CO_2$ în atmosferă (0,032%) este un factor limitant al fotosintezei, deoarece este inferioară celei care asigură un randament optim (Atanasiu, 1984).

Formarea de CO s-ar realiza pe cale biologică, prin două mecanisme încă neelucidate:

a) Printr-o reacție fotochimică independentă de fotosinteză și de concentrația $CO_2$, dar implicînd participarea pigmenților fotosintetici ai cianobacteriilor și ai algelor. Intensitatea producției de CO este proporțională cu intensitatea luminii.

b) În cursul respirației microorganismelor și a animalelor, ca rezultat al degradării compușilor care conțin gruparea hem.

În măsura în care acest fenomen este caracteristic întregii suprafețe a oceanului planetar ($3{,}61 \times 10^8$ km$^2$), producția de CO în stratul superior adînc de 2 m ar putea fi de $9 \times 10^{12}$ g CO (5% din cantitatea de CO produs antropogen).

3) *Producerea de CO prin arderea combustibililor fosili și mai ales a biomasei lemnoase* este apreciată de Robbins și colab. (1969) la $2 \times 10^{14}$ g CO (200 milioane de tone), iar de Steiler (1978) la $6{,}4 \times 10^{14}$ g/an. Motoarele cu combustie internă pot determina creșteri locale ale concentrației de CO. Ele sînt nesemnificative la nivel global, unde acționează, în special, procese guvernate de surse naturale.

*Îndepărtarea CO și împiedicarea acumulării lui* în doze toxice se realizează pe două căi majore:

1) Prin transportare în troposferă urmată de conversie rapidă la $CO_2$, prin reacții fotochimice. Procesul este condiționat de prezența OH în cantități suficiente și evoluează după reacția:

$$CO + {}^{\bullet}OH \rightarrow CO_2 + {}^{\bullet}H$$

2) Prin fixare în sol, urmată de conversia la $CO_2$ pe cale biologică. Acest mecanism ar asigura conversia a $4{,}1 \times 10^{14}$ g CO din atmosferă (0,4 miliarde tone) (Bartholomew și Alexander, 1981).

## Rolul microorganismelor în circulația CO

Microorganismele au un rol esențial în conversia CO la $CO_2$ și în circulația acestuia în natură. Ele realizează acest rol pe cale aerobă sau anaerobă.

1) Bacteriile care oxidează monooxidul de carbon formează grupul fiziologic *Carboxydobacteria*. El include bacterii chemolitotrofe facultative, cu metabolism strict aerob, care se dezvoltă pe medii minerale, în prezența a 5 — 20% (vol/vol) oxigen și 20—95% (vol/vol) CO.

Cele mai cunoscute aparțin speciilor: *Pseudomonas carboxidovorans, P. carboxidoflava, P. carboxidohydrogena, P. gazotropha, Achromobacter carboxidus, Comamonas compransoris, Seliberia carboxidohydrogena.*

Ele formează, în prezența CO, o CO-oxireductază, care asigură oxidarea acestuia la $CO_2$, după reacția:

$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + 2e^- + 2H^+$$

În funcție de condițiile de creștere, o parte (4 — 16%) din CO este convertit în biomasă celulară (Zavarzin, 1977; Meyer și Schlegel, 1978).

Bacteriile care oxidează CO sînt prezente în diferite tipuri de sol, în deșeuri organice și gunoaie, precum și în bazinele acvatice naturale și în stratul superior de nămol al apelor poluate. CO format în regiunile anaerobe ale solului și la fundul bazinelor acvatice difuzează la suprafață, unde este

oxidat aerob la $CO_2$. Liebl și Seiler (1976) apreciază că oxidarea bacteriană a CO are loc în sol cu o rată globală de $5 \times 10^{14}$ g/an, care asigură conversia la $CO_2$ a aproximativ 50% din CO total produs în mediu (fig. 321).

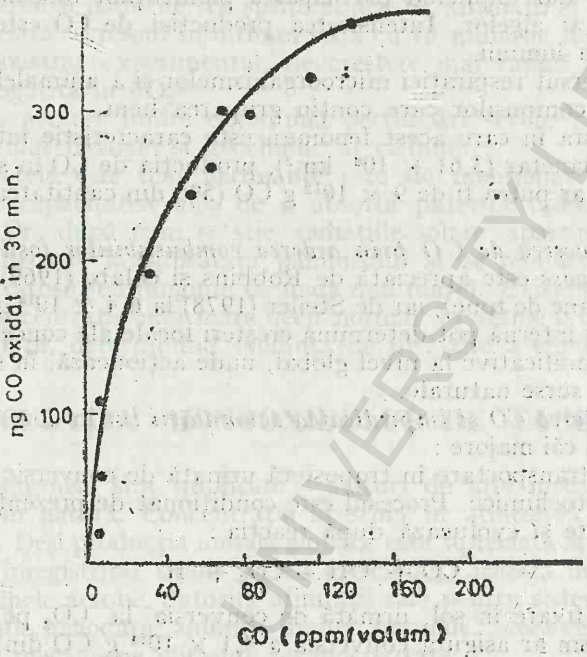



Fig. 321. — Influența concentrației de monooxid de carbon asupra vitezei de oxidare a $CO_2$ în sol (după Bartholomew și Alexander, 1981).

2) *Oxidarea CO în anaerobioză* este efectuată în natură de o serie de bacterii autotrofe sau heterotrofe, care pot utiliza CO pentru creștere, dar nu ca sursă unică de C. De aceea, aceste bacterii nu pot fi considerate ca aparținînd grupului *Carboxydobacteria*. Astfel, *Methanosarcina barkeri* poate reduce CO la $CH_4$ după reacția :

$$CO + 3\,H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$$

iar bacteria acetogenă *Clostridium thermoaceticum* îl reduce la acetat :

$$2\,CO + 2\,H_2 \rightarrow CH_3COOH$$

Procese de oxidare a CO în anaerobioză au mai fost descrise la *C. perfringens*, *C. pasteurianum*, ca și la *Desulfovibrio desulfuricans*.

**Aplicații practice.** Pe baza capacității carboxidobacteriilor de a converti CO la biomasă celulară s-a preconizat utilizarea lor pentru producerea de biomasă celulară („Single cell protein"), prin folosirea directă a gazelor reziduale (CO, $H_2$, $CO_2$) produse de furnale, de industria chimică, a cărbunelui, vapoare etc., realizînd simultan și un efect depoluant.

Meyer (1980) a demonstrat că gazele de eșapament ale automobilelor rezultate din combustia a 20 l de benzină sînt suficiente pentru producerea de 25 g celule bacteriene. Teoretic, utilizarea gazelor reziduale auto pe plan mondial ar permite producerea a 768,694 tone masă celulară/an.

## CIRCULAȚIA FOSFORULUI ÎN NATURĂ

**„Dintre toate elementele prezente în organismele vii, fosforul este, probabil, cel mai important din punct de vedere ecologic. Raportul fosforului față de alte elemente din organisme tinde să fie considerabil mai mare decît cel din sursele primare ale elementelor biogene. De aceea, este mai probabil ca deficitul în compuși ai fosforului să limiteze productivitatea oricărei regiuni de pe suprafața pămîntului mai mult decît deficitul oricăror altor molecule, cu excepția apei".**

G. E. HUTCHINSON

Fosforul este, de asemenea, un element esențial pentru existența sistemelor biologice datorită prezenței sale atît în componența unor constituenți cu rol de purtători de informație genetică sau structurală, cît și în activități legate de procese fundamentale ale metabolismului energetic. Între acestea, cele mai importante sînt : moleculele de ADN și ARN, fosfolipidele din structura membranelor celulare, glicerofosfații, unele coenzime, precum și moleculele de ADP și ATP cu rol major în acumularea și eliberarea de energie în cursul metabolismului celular. Fosforul este, de asemenea, prezent în moleculele de fitină provenite din țesuturile vegetale, precum și în compoziția oaselor, ca fosfat de calciu (85%) și ca fosfat de Mg (1,5%).

*Rezervorul major* în natură, format în cursul erelor geologice, este reprezentat de roca fosfatică apatita ($3Ca_3(PO_4)_3 \cdot CaF_2$), insolubilă.

În sol, ea se găsește și sub forma unor minerale secundare de tipul fosfaților hidratați ca *strengita* ($FePO_4 \cdot 2H_2O$) și *variscita* ($AlPO_4 \cdot 2H_2O$). În solurile acide, fosfații sînt precipitați pe suprafața unor oxizi de Fe și Al sau atașați pe cristale de silicat ca, de exemplu, pe caolinit (silicat natural hidratat de Al) sau pe montmorillonit (silicat natural de Al, Mg și Fe). Acest proces este numit „fixarea fosfaților" (Haymann, 1975).

Se apreciază că tot fosforul prezent în sol provine din procesul de eroziune treptată și foarte lentă la care este supusă apatita. În ansamblu însă, 95 — 99% din fosforul prezent în sol este în forme inaccesibile direct plantelor și microorganismelor. Din aceasta, 30 — 85% se găsește sub formă de compuși organici (Moulder, Lie și Woudendorp, 1969), proveniți în special din resturile vegetale și animale, și parțial din microorganisme. Ei sînt mai abundenți în straturile superficiale și progresiv mai săraci odată cu adîncimea. Dintre aceștia, fitina poate reprezenta 25 — 90% din total, acizii nucleici 15 — 25%, cărora li se adaugă fosfolipidele, glucidele fosforilate ș.a.,

în cantități variabile după caz. Se adaugă prezența fosfaților anorganici insolubili ca fosfat de Ca în mediile alcaline sau neutre și a fosfaților de Fe și Al în mediu acid.

Fosfații sînt prezenți sub două forme, respectiv solubili și insolubili. În fosfații primari ($NaH_2PO_4$), foarte solubili în apă, numai una din cele trei valențe ale $PO_4^{3-}$ este legată de un metal. Fosfații secundari ($Na_2HPO_4$) au numai un atom de H, iar cei terțiari ($Na_3PO_4$) nici unul. Solubilitatea lor în apă este progresiv mai mică. În mediile acvatice, fosfații sînt prezenți în concentrații foarte mici. Ei sînt concentrați de mai multe ori în celulele algelor și ale altor microorganisme și transferați sub formă de combinații organice la animalele care se hrănesc cu fitoplancton.

## Rolul microorganismelor în circuitul fosforului

Microorganismele sînt implicate în patru mecanisme majore ale transformării fosforului în circulația acestuia în natură :

1) Mineralizarea compușilor organici ai fosforului din sol, de către microorganisme heterotrofe și regenerarea ortofosfaților solubili.

2) Solubilizarea fosfaților anorganici (în particular, a fosfatului tricalcic $Ca_3(PO_4)_2$ și a fosfaților de Fe, Al, Mg etc. și eliberarea de fosfați solubili accesibili plantelor.

3) Imobilizarea fosforului în celulele microorganismelor. Procesul are loc și în organismele plantelor și animalelor, prin sinteza de acizi nucleici, fosfolipide, fitină, glucide fosforilate etc. Acest proces de conversie a formelor anorganice la constituenți celulari scade cantitatea de P disponibil în sol.

4) Procese de oxidare a fosforului anorganic.

Figura 322 sintetizează căile de evoluție ale acestor transformări.

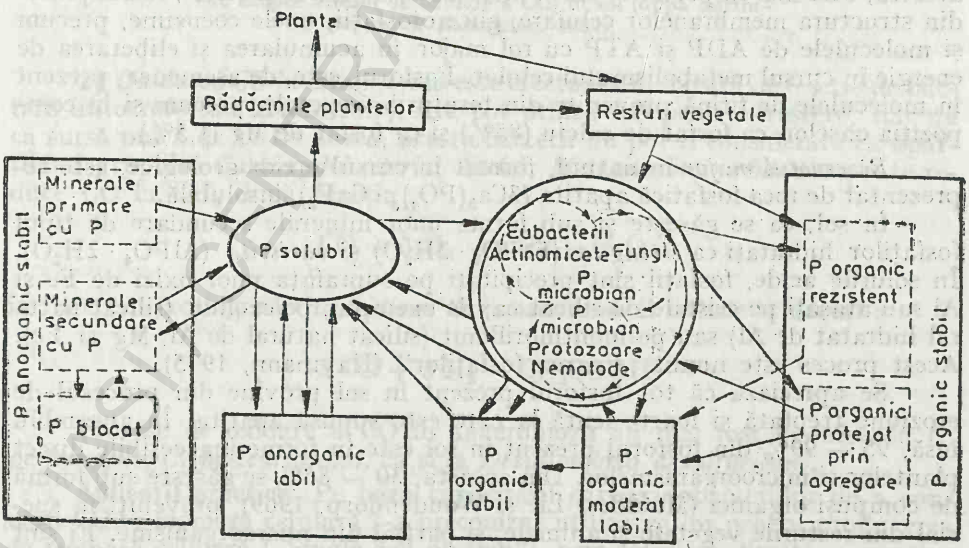



Fig. 322. — Fluxul formelor organice și anorganice ale fosforului în ecosistemele terestre. Schema evidențiază modul în care interacțiunile microorganismelor și faunei afectează fluxul fosforului accesibil organic și anorganic (după Stewart și Mc Kercher, 1982).

## Mineralizarea

Compușii organici ai fosforului, proveniți din resturile vegetale, animale și din microorganisme, reprezintă o rezervă foarte mare a acestui element, inaccesibilă plantelor.

Mineralizarea este efectuată de o gamă largă și foarte diversă de microorganisme, reprezentînd 50% și, în unele cazuri, 70—80%, din microbiota solului (Hayman, 1975). Între cele mai active sînt menționate: *Bacillus megateriium* var. *phosphaticus*, *B. subtilis*, *B. asterosporus*, *Arthrobacter* sp., *Proteus* sp., *Serratia*, *Streptomyces*, precum și fungii din genurile: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Candida*.

Degradarea implică participarea unui număr mare de enzime de tipul nucleazelor, fosfolipazelor, fosfatazelor, glicerofosfatazelor etc. Spre exemplu, fitina, sarea de Ca și Mg a acidului fitic, este degradată foarte lent, mai ales în solurile acide, sub acțiunea *fitazei*, enzimă sintetizată de numeroase microorganisme, bacterii (*Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp.) sau fungi (*Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Rhizopus* etc.). Fitaza hidrolizează legătura ester—fosfat pentru a produce inozitol și ortofosfat.

În general, procesul de mineralizare evoluează mai rapid cu compușii fosforului proveniți din celulele microbiene, vegetale și animale și este favorizat de autoliza celulelor moarte. Este favorizat de temperaturi mai mari de 20°C și este mai activ în cazul microorganismelor termofile decît în al celor mezofile. Diferiții compuși organici (inclusiv acizii nucleici și fitina) devin mai rezistenți la degradare dacă reacționează cu compușii solului: ADN fixat pe argilele minerale cu bentonită este protejat de degradarea rapidă. La fel compușii organici din turbă și humus sînt în mod deosebit rezistenți la degradarea microbiană, datorită legării lor de particule de materie organică rezistentă la degradare, care le asigură protecția. Creșterea valorii de pH a mediului spre alcalinitate ameliorează procesul de mineralizare și stimulează producerea de fosfați anorganici solubili sub acțiunea microorganismelor.

La sfîrșitul procesului de mineralizare, ortofosfații solubili produși urmează două căi:

1) O parte sînt asimilați de populația de microorganisme care i-a solubilizat și în felul acesta eliberarea prin mineralizare este asociată cu imobilizarea. Cea mai mare parte este preluată de către plante sub forma ionilor de fosfat prezenți în soluția solului și utilizată în metabolismul acestora.

După Hayman (1975), concentrația medie a ortofosfatului în soluția solului este în jur de $10^{-6}$ M (aproape de limita la care poate fi preluat de către plante). Concentrația-prag diferă însă de la o plantă la alta, în funcție de viteza de creștere și de tipul de metabolism. Unele plante cresc bine numai la $10^{-3}$M, iar altele cresc (însă slab) și la $10^{-7}$M.

Absorbția fosfaților necesită consum mare de energie, deoarece concentrația lor în rădăcinile plantelor este de 1000 de ori mai mare decît în soluția solului. În unele cazuri, fenomenele acestea de imobilizare și preluare de către plante sînt atît de rapide încît în unele medii acvatice fosfatul anorganic poate fi absent, iar în sol apare un deficit evident de P, în regiunile în care rădăcinile competiționează cu microorganismele pentru acest element.

2) Cea de-a doua cale constă în convertirea ortofosfatului solubil la forme greu solubile, neaccesibile microorganismelor sau plantelor, sub formă

de fosfați de Ca, Mg, Fe sau Al * etc. Utilizarea acestor forme insolubile de către alte populații de microorganisme auto- sau heterotrofe, ca și de plante nu este posibilă decît după solubilizarea lor prealabilă.

### Solubilizarea fosfaților anorganici

Microorganismele acționează solubilizînd fosfații anorganici naturali insolubili în forme solubile accesibile plantelor.

În sol, procesul are loc cu precădere în rizosferă, unde asimilarea are loc cu intensitate maximă. După Swaby și Sperber (1959), aproximativ 20 — 40% din eubacteriile, actinomicetele și microfungii din rizosfera celor mai multe plante cultivate sînt capabile să dizolve hidroxiapatita (în restul solului, frecvența este de numai 10—15%). Exsudatele radiculare și celulele descuamate furnizează substratul care stimulează dezvoltarea microorganismelor. Coloniile de bacterii situate de-a lungul rădăcinilor solubilizează fosfații cu ajutorul acizilor organici și al $CO_2$ produși de microorganisme și, uneori, de plante, chiar în cantități mai mari.

Rolul microorganismelor a fost demonstrat de Gerretsen (1948), care a cultivat plante de stejar în vase cu nisip de cuarț steril sau nesteril (prin adăugare de sol de grădină 1%), în prezența a patru surse de fosfor : 1) ferofosfat ; 2) $CaHPO_4$ ; 3) $Ca_3(PO_4)_2$ și 4) făină de oase. Figura 323 prezintă diferențele în cantitatea de $P_2O_5$ preluat de plante și implicit rolul solubilizant al microorganismelor.

Printre microorganismele incriminate cel mai frecvent sînt de menționat, dintre bacterii : *Achromobacter, Flavobacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Pseudomonas, Streptomyces*, iar dintre fungi : *Aspergillus, Penicillium, Sclerotium.*

Au fost descrise mai multe mecanisme :

1) *Formarea de acizi organici*, de tipul acizilor formic, acetic, propionic, lactic, glicolic, oxalic, citric, fumaric și succinic, pare să fie mecanismul major de solubilizare a fosfaților anorganici, mai ales în mediile bogate în glucide. Numeroase bacterii ce produc acizi organici (între care *Bacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Escherichia* sp., *Micrococcus, Pseudomonas* sp. etc.) solubilizează chiar formele cele mai rezistente, cum este fosfatul tricalcic $(Ca_3PO_4)_2$ din oase.

Procesul a fost demonstrat și experimental : acizii organici dizolvă fosfații insolubili încorporați sub formă de particule fine în agar, determinînd apariția de zone clare în jurul coloniilor. Unele bacterii produc acid 2-cetogluconic cu rol chelator față de calciu. Solubilizarea Ca este asociată cu eliberarea simultană în soluție a ortofosfatului pentru a restabili echilibrul chimic.

2) *Producerea de acizi anorganici* de către microorganisme chemolitotrofe (*Nitrosomonas, Thiobacillus* sp.) ca acid azotic, acid sulfuric etc. cu acțiune asupra rocii fosfatice și eliberarea de fosfați solubili.

3) *Producerea de $CO_2$* de către microorganismele heterotrofe și de rădăcini stimulează solubilizarea fosfaților, în special în rizosferă, după reacția :

$$Ca_3(PO_4)_2 + 4\,CO_2 + 5\,H_2O \rightarrow Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O + 2\,Ca(HCO_3)_2$$

*. Disponibilitatea fosforului în biosferă este limitată de tendința de a precipita în prezența $Ca^{2+}$, a $Mg^{2+}$ și a $Fe^{3+}$ (ion feric), la pH neutru spre alcalin.

4) *Producerea de $H_2S$* de către bacteriile sulfat-reducătoare (*Desulfovibrio* sp.), în special în solurile băltite, mărește disponibilitatea de fosfați solubili pentru plante. $H_2S$ mobilizează fosfatul feric, producînd sulfură feroasă (neagră) și ioni solubili de ortofosfat.

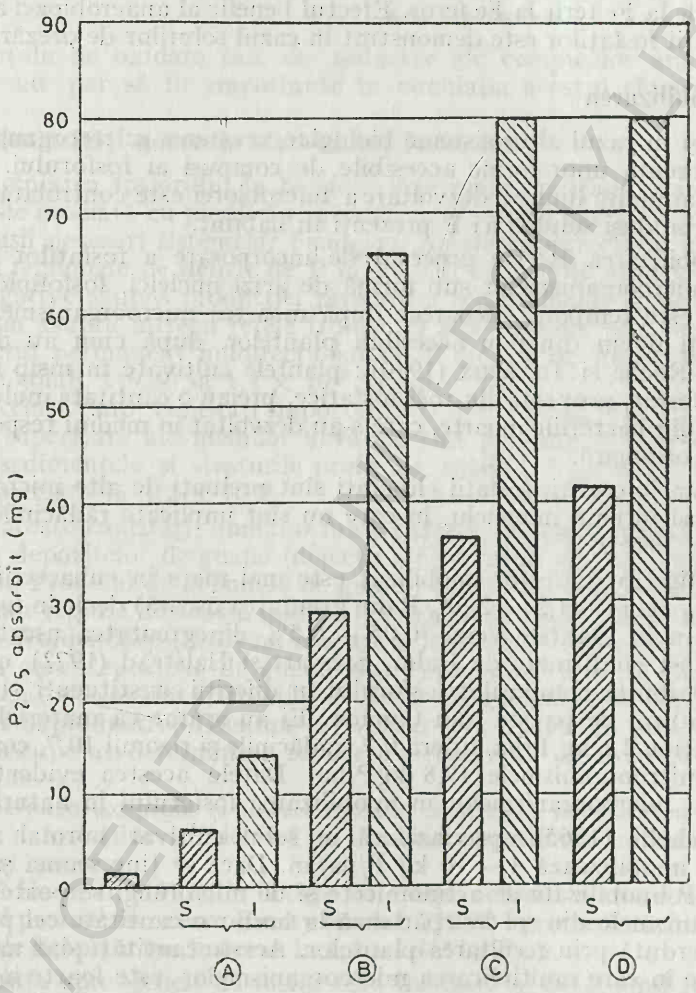



Fig. 323. — Înglobarea fosforului de plăntuțele de stejar în nisip de cuarț steril (S) sau inoculat (I) cu microorganismele din sol. Sursa de fosfor: A. Ferofosfat. B. $CaHPO_4$. C. $Ca_3(PO_4)_2$. D. Praf de oase (după Gerretsen, 1948).

5) *Efectul substanțelor humice.* Acidul humic și acidul fulvic din resturile vegetale degradate de microorganisme în sol se pot chela cu Ca, Fe și Al, pentru a forma fosfați cu structură complexă, eliberînd, în același timp, ortofosfat solubil. Ei pot forma, de asemenea, complexe solubile stabile cu Fe sau cu P și Al, accesibile ca atare rădăcinilor plantelor.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6) *Efectul condițiilor reducătoare.* Cînd solurile băltite sînt menținute în anaerobioză prelungită, în prezența materiei organice în descompunere, o mare parte din fosfatul feric este convertit la forme solubile. Degradarea anaerobă a materialelor organice de către microorganisme, în condițiile mediului respectiv, modifică potențialul redox al solului, determinînd reducerea Fe de la Fe feric la Fe feros. Efectul benefic al anaerobiozei asupra disponibilității fosfaților este demonstrat în cazul solurilor de orezării.

### Imobilizarea

Ca și în cazul altor sisteme biologice, creșterea microorganismelor necesită prezența unor forme accesibile de compuși ai fosforului. Ceva mai mult, în anumite limite, dezvoltarea microbiotei este controlată de cantitatea de produși solubili ai P prezenți în habitat.

Imobilizarea P este procesul de încorporare a fosfaților solubili în celulele microorganismelor sub formă de acizi nucleici, fosfolipide etc. Fenomenul este temporar, deoarece după moartea microorganismelor fosfații imobilizați devin din nou accesibili plantelor, după cum au demonstrat Tardieux-Roche și Tardieux (1970) : plantele cultivate în nisip la care s-a adăugat fosfat, provenit din roci fosfatice, preiau o cantitate mult mai mare de fosfat din bacteriile moarte, care s-au dezvoltat în mediul respectiv, decît din roca originară.

În unele cazuri, fosfații eliberați sînt preluați de alte microorganisme și introduși într-un miniciclu, în care nu sînt implicate rădăcinile plantelor (Hayman, 1975).

Cantitatea de fosfor imobilizat este mai mare în eubacterii și actinomicete (care conțin 1,5 — 2,5% P din greutatea uscată) decît în fungi (0,5 — — 1%) sau în plantele verzi (0,05 — 0,5% din greutatea uscată). Aceste date au fost confirmate de Halm, Stewart și Halstead (1972), care au urmărit distribuția compușilor fosforului în diferiții constituenți ai unui ecosistem natural de pajiște din Canada. Ei au arătat că materialul vegetal verde conține 2,1 kg P/ha, litiera 0,7, rădăcinile și rizomii 10,7, consumatorii 1,0, iar microorganismele 19,8 kgP/ha. Datele acestea evidențiază rolul esențial al microorganismelor în imobilizarea fosforului în natură.

Sauchelli (1965) apreciază că în solul cultivat normal numai eubacteriile imobilizează 4 — 10 kg P/ha/an. Dacă se ține seama și de cantitățile de P imobilizate de actinomicete și de microfungi se poate afirma că microorganismele din sol îndepărtează la hectar o cantitate cel puțin egală cu cea pierdută prin recoltarea plantelor. Aceste cantități sînt mult mărite în cazurile în care multiplicarea microorganismelor este foarte intensă (așa cum se întîmplă în prezența unor substanțe organice în curs de descompunere, adăugate în sol).

### Oxidarea și reducerea fosfatului anorganic

Ortofosfatul este starea cea mai oxidată a fosforului. Unele microorganisme aerobe pot utiliza fosfații $HPO_3^{2-}$, convertindu-i la fosfat. Reacția sumară (pentru acizii respectivi) este :

$$\underset{\text{Acid fosforos}}{H_3PO_3} + 1/2O_2 \rightarrow \underset{\text{Acid ortofosforic}}{H_3PO_4}$$

În solul foarte umed, în anaerobioză, unele bacterii ca, de exemplu, *Clostridium butyricum* pot efectua reacția inversă, de reducere a fosfatului la fosfit și la hipofosfit după reacția :

$$H_3PO_4 \rightarrow H_3PO_3 \rightarrow H_3PO_2$$

Acid hipofosforos

Reacțiile de oxidare sau de reducere ale compușilor anorganici ai fosforului nu par să fie importante în circulația acestui element în sol.

**Particularități generale ale ciclului fosforului**

Recircularea fosforului în biosferă este numai parțială, datorită faptului că este asociată cu pierderi continue, care sustrag cantități importante din compușii necesari sistemelor biologice. Aceste imperfecțiuni ale ciclului determină fenomene de deficit de P în sol sau în mediile acvatice, cu consecințe negative asupra producției primare a ecosistemelor respective și cu repercusiuni asupra întregii rețele trofice. O altă pierdere este reprezentată de transferul permanent unidirecțional de P din sol în mare, apreciat de Ehmery și colab. (1959) la $1{,}4 \times 10^{10}$ kg/an.

În același timp, cantități importante ($1{,}3 \times 10^{22}$ kg/an) de fosfor din straturile superioare ale mediilor acvatice sînt pierdute pentru viață, îmbogățind sedimentele și straturile profunde, mărind rezerva de fosfor din oceane, apreciată la $1{,}2 \times 10^{14}$.

Din aceste cantități, numai o mică parte se întoarce în sol, în special sub forma depozitelor de guano (dejecții ale păsărilor marine), apreciate la 10 000 t/an. Procesul de depunere de guano, care a asigurat fertilitatea deosebită a unor regiuni de coastă marine (Peru), este continuu, iar după Moulder, Lee și Woldendorp (1969) nu mai are intensitatea din trecut. Exceptînd cazurile în care depozitele de guano sînt exploatate, fosforul din ele este aproape izolat și scos din circulație, deoarece, în general, este depus în zone izolate sau neproductive (Benton și Werner Jr., 1976). În plus, pescuitul marin și oceanic ar determina o reducere a rezervelor de P cu 60 000 kg P elementar/an.

Numeroase exemple și date concrete ilustrează necesitatea acută de regenerare a fosfaților în biosferă și implicit importanța microorganismelor în acest proces.

După Hayman (1975), în fiecare an, fitoplanctonul marin consumă 1% din fosforul prezent în ocean. Emery și colab. (1959) apreciază cantitatea de P consumat de fitoplancton în ocean la $1{,}3 \times 10^{12}$ kg P/an.

Tendința spre deficit de fosfor este ilustrată și de studiul lui Duvigneaud și Deaeyer-Desmet (1970), care evidențiază faptul că într-o pădure de stejar din Belgia unde se recoltează anual 6,9 — 9,4 kg P/ha/an, numai 5,4 kg P/ha/an se reîntorc în sol ca litieră.

Hayman (1975) apreciază că recolta medie a unor plante de cultură îndepărtează 10 sau peste 10 kg P/ha/an, adică de cîteva sute de ori mai mult fosfor decît poate fi găsit de rădăcinile plantei în soluția solului. În solurile normale, plantele nu întîlnesc o concentrație adecvată de fosfat la nivelul suprafeței rădăcinilor, deoarece, deși eliberarea fosfaților în soluția solului este foarte rapidă pentru marea masă a solului, rădăcinile sînt în contact numai cu un volum foarte mic de sol.

Ca urmare, fosfații solubili sînt epuizați la nivelul suprafeței rădăcinii (cel mai adesea nu complet), ceea ce necesită o reaprovizionare cu fosfați solubili din solul mai îndepărtat. După cum s-a demonstrat, există o difuzie a fosfaților datorită gradientului de concentrație din regiunile unde aceștia sînt prezenți în cantități mai mari, dar procesul efectiv este îngreuiat de obstacole fizice (particulele fine de sol) și de fenomene de adsorbție reversibilă pe suprafața acestora.

În concluzie, după Hayman (1975), reaprovizionarea rădăcinilor cu fosfați solubili este mai lentă decît procesul de încorporare a acestora în plante, fapt care determină în jurul rădăcinii, respectiv în rizosferă, o zonă largă de lipsă de fosfat de 1 — 2 mm.

Tratarea semințelor cu bacterii care solubilizează fosfații (*B. megaterium* var. *phosphaticus* ca în preparatul „*Fosfobacterin*") nu a dat rezultatele scontate, în primul rînd datorită faptului că bacteriile cu proprietăți similare nu lipsesc din sol. Ele ar putea îndeplini acest efect cu succes, dacă condițiile generale din sol ar fi favorabile activității de solubilizare a fosfaților.

În schimb, utilizarea ca fertilizatori a „superfosfaților" primari sau secundari (obținuți prin tratamentul acid al fosfatului terțiar din apatită) stimulează, în oarecare măsură, activitatea microorganismelor prezente normal în sol.

## CIRCULAȚIA SULFULUI ÎN NATURĂ

**„Ciclul sulfului nu este numai o reprezentare schematică a reacțiilor implicate în transformările compușilor organici și anorganici ai sulfului, ci reprezintă, de asemenea conceptual, un sistem biologic relativ simplu pentru utilizarea energiei radiante și parțial un suport pentru viață".**

H. D. Peck Jr.

Larg răspîndit în natură în sol, ape și atmosferă, sulful este, asemenea altor elemente comune, un component esențial al biosferei, ca parte a structurii chimice a organismelor vii. După Bestougeff (1974), sulful ocupă locul treisprezece în ceea ce privește distribuția cantitativă a elementelor în natură. Aceasta explică de ce sulful este numai rareori un element limitant pentru creșterea plantelor, pentru productivitatea sau dezvoltarea biologică în general, în condiții naturale.

În funcție de tipul de celulă și de mediul din care provine, citoplasma conține 0,4 — 1% S sub forma unor compuși organici.

Ca și alte elemente, sulful suferă în natură o serie de transformări ciclice, care îl aduc în concentrații convenabile și în forme accesibile organismelor vii.

## Prezența și biochimia compușilor sulfului în mediile naturale

Sulful este prezent în natură în două forme :

1) În formă anorganică, în depozitele de sulf elementar($S^0$), sau într-o varietate de compuși reduși ($H_2S$, diferite sulfuri metalice) sau oxidați ca dioxid de sulf ($SO_2$), trioxid de sulf($SO_3$), tiosulfați ($S_2O_3^{2-}$), tetrationați ($S_4O_6^{2-}$), sulfați ($SO_4^{2-}$) sau $H_2SO_4$.

2) În formă organică, în compoziția unor aminoacizi (cistină, cisteină, metionină), a glutationului.

**Hidrogenul sulfurat** ($H_2S$) este prezent în natură în bălți, izvoare sulfuroase, gaze naturale, precum și în medii cu substanțe organice în curs de degradare. Are origine vulcanică, hidrotermală sau biologică (produs al activității microorganismelor).

Cantitatea de $H_2S$ degajată normal în atmosferă este greu de apreciat cu exactitate. Unii cercetători o estimează la $70 \times 10^6$ tone/an, alții la valori superioare ($86 \times 10^6 - 112 \times 10^6$ tone/an). Exceptînd unele condiții speciale (de anaerobioză), $H_2S$ nu se acumulează în natură deoarece în prezența $O_2$ este rapid oxidat spontan la $SO_2$.

În mediile acvatice este produs de microorganisme în straturile profunde și în nămol, unde, în general, nu se poate acumula datorită circulației verticale a apei, determinată de diferențele diurne sau sezoniere de temperatură și de curenții de aer. Ajuns la suprafață, $H_2S$ este oxidat la sulfat. Procesul este foarte important, deoarece acumularea $H_2S$ are efecte toxice asupra diferitelor organisme acvatice. Hidrogenul sulfurat poate fi oxidat prin reacții care implică participarea oxigenului atomic (O) sau molecular ($O_2$), sau a ozonului ($O_3$). Oxigenul atomic este produs în cantități mici în troposferă *, în special în cazul aerului foarte poluat prin fotoliza $O_3$ și a dioxidului de N ($NO_2$). În mezosferă * și în stratosferă*, este produs în cantități mai mari prin fotoliza $O_2$ și $O_3$.

Oxidarea $H_2S$ de către oxigenul atomic este realizată în cea mai mare măsură în smogul fotochimic și în stratosferă, după reacția :

$$H_2S + O \rightarrow OH + HS$$

Ulterior, HS este transformat printr-o secvență de reacții la $SO_2$, $SO_3$ și $H_2SO_4$ (Kellog și colab., 1971).

Oxidarea $H_2S$ de către oxigenul molecular s-ar realiza datorită solubilității lor în apă, probabil, cu o viteză relativ mare în picăturile din nori sau din ceață.

În sfîrșit, din reacția $H_2S$ cu $O_3$ rezultă, în principal, $SO_2$ și $H_2O$. Reacția pare să fie foarte lentă, exceptînd cazul că are loc în prezența particulelor de aerosoli care oferă suprafețe mai mari de acțiune.

**Dioxidul de sulf** ($SO_2$) rezultă din oxidarea $H_2S$, din gazele industriale etc. Se apreciază că $SO_2$ reprezintă aproximativ 95% din compușii sulfului rezultați din arderea combustibililor fosili.

---

* *Troposferă* — stratul atmosferic de la sol pînă la înălțimea de 10 — 15 km.
*Stratosferă* — stratul atmosferic cuprins de la 15 km deasupra Terrei pînă la 50 km.
*Mezosferă* — stratul situat deasupra stratosferei, la 50—80 km deasupra suprafeței pămîntului.

$SO_2$ este redus la $H_2S$ prin acțiunea bacteriilor, iar în aer este oxidat la $SO_3$ prin acțiunea radiațiilor ultraviolete și a altor reactanți sau catalizatori. $SO_2$ poate interacționa și cu oxigenul atomic, după reacția :

$$SO_2 + O + M \rightarrow SO_3 + M$$

în care M este o moleculă de $O_2$ sau $N_2$; al treilea component al reacției M preia excesul de energie din reacție, împiedicînd reversia ei.

**Trioxidul de sulf($SO_3$)**, format prin reacția descrisă, reacționează prompt cu vaporii de apă pentru a forma $H_2SO_4$. Acesta se combină cu apa, formînd picături de $H_2SO_4$ în soluție.

**Sulfații** provin din roci sau din apa de ploaie în care derivă probabil de la $SO_2$ din aer. Se găsesc, de asemenea, în apele naturale, în special în lacurile sărate, bogat mineralizate în mări și oceane.

Odată format, sulfatul este extrem de stabil la reducere chimică. Cele mai multe reduceri ale sulfului în natură sînt rezultatul acțiunii directe a bacteriilor sulfatreducătoare. Astfel, în sol și în regiunile mlăștinoase, în anaerobioză, sulfații sînt reduși la $H_2SO_4$ și S. În urma acestui proces, $H_2S$, care difuzează spre straturile superioare, poate fi transformat, printr-o serie de reacții de oxidare, la $SO_2$, $SO_4^{2-}$, în timp ce sulful elementar (S°) este depus ca atare. În mod asemănător, în adîncul oceanelor, sulfatul dispersat poate fi redus de bacteriile oceanice la $SO_2$, $H_2S$ și S°.

Acidul sulfuric reacționează cu amoniul prezent în atmosferă pentru a forma sulfat sau bisulfat de $NH_4$ sau cu particulele de NaCl, formînd sulfat de Na și HCl gazos. Prezența sulfaților și a $H_2SO_4$ a fost evidențiată în atmosferă chiar la înălțimea de 18 km.

Figura 324 sintetizează diferitele procese chimice ce pot avea loc în natură în mediile care conțin sulf.

## ORIGINEA COMPUȘILOR SULFULUI ÎN ATMOSFERĂ

Atmosfera primește continuu cantități semnificative, deși greu de estimat, de compuși ai sulfului.

*Emanațiile vulcanice* conțin diferiți compuși ($SO_2$, $H_2S$, diferiți sulfați și mici cantități de $SO_3$ și de sulf elementar) în cantități globale și relativ diferite de la un vulcan la altul și chiar de la o emanație la alta. Ele sînt apreciate, în general, la $1,5 \times 10^6$ tone/an și sînt evident mult mărite în cursul perioadelor de activitate ale vulcanilor.

O altă sursă importantă de sulfat în atmosferă este reprezentată de *particulele de sare marină*, formate prin ruperea miliardelor de particule determinate de valuri și proiectate în aer. Erikson (1960) apreciază cantitatea de $SO_4^{2-}$ proiectată în atmosferă deasupra oceanelor la $130 \times 10^6$ tone/an, din care 10% se depun pe continent, iar restul revin înapoi în ocean. Calculul are la bază faptul că sulfatul este unul din cei mai comuni anioni în mediile acvatice marine și oceanice.

Oceanul este și o sursă de $H_2S$ importantă, deși datele cantitative sînt foarte contradictorii. Erikson (1960) apreciază cantitatea de $H_2S$ emis la $202 \times 10^6$ tone/an, iar Robinson și Robbins (1968) la numai $30 \times 10^6$ tone/an. Este probabil că, cu unele excepții (Marea Neagră), cifrele mai mici sînt mai apropiate de realitate, deoarece viteza de oxidare spontană a $H_2S$ în prezența oxigenului este foarte mare.

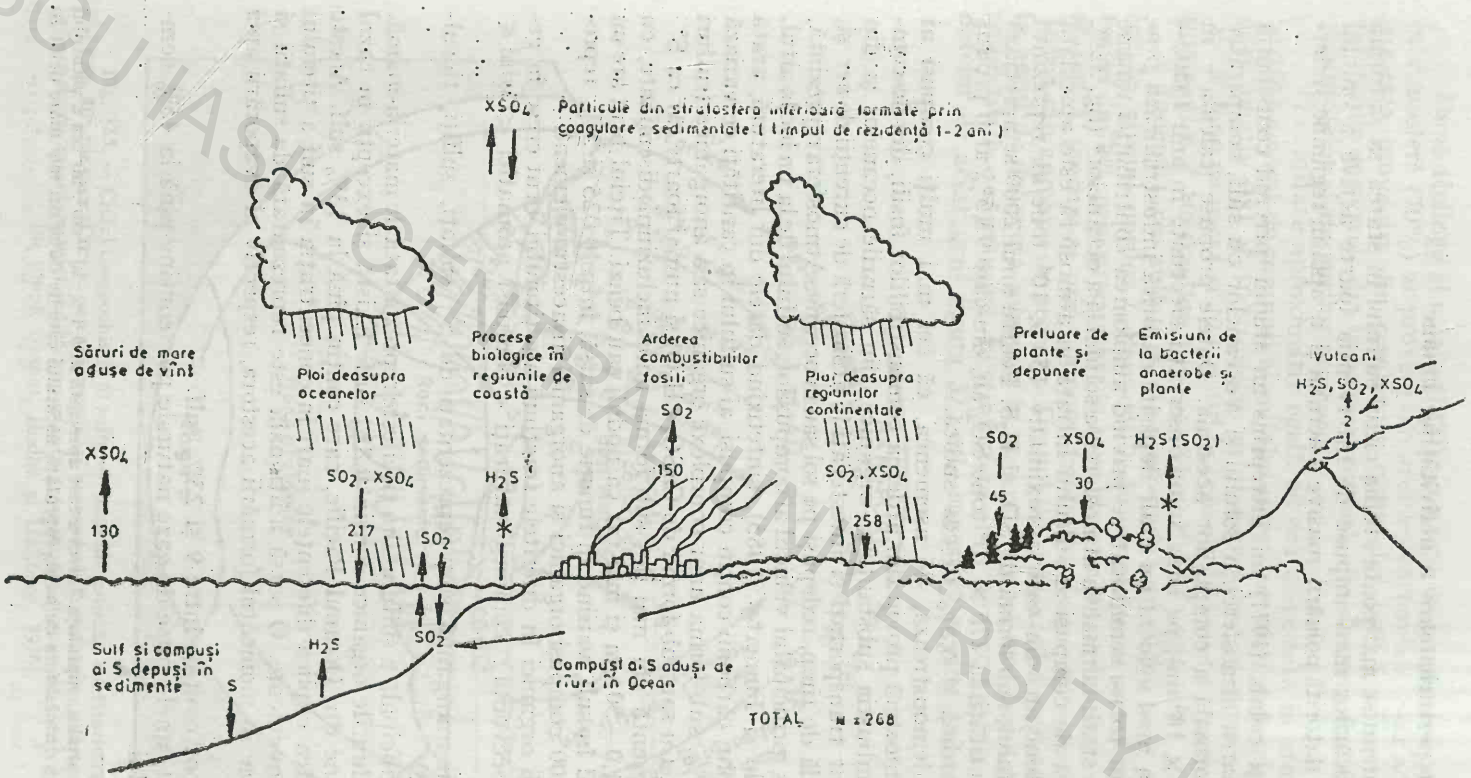



Fig. 324. — Surse și depuneri de compuși ai sulfului din atmosferă. Cifrele reprezintă $10^6$ tone calculate ca sulfat/an (după Kellogg și colab., 1972).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

### Influența perturbatoare a activităților umane

În prezent nu se mai poate studia ciclul sulfului în starea sa naturală datorită modificărilor mari impuse de intervenția foarte activă a omului și, în principal, datorită poluării masive a aerului și a apei în regiunile industrializate.

Kellogg și colab. (1971) au întreprins un studiu privind contribuția omului la poluarea atmosferei, a solului și a oceanelor cu sulf, comparativ cu prezența normală a compușilor acestuia. Datele propuse (calculate în tone de sulfat $\times 10^6$/an), pe baza unor observații efectuate în anii 1950 — — 1960, sînt în mod evident cu mult depășite datorită industrializării progresive. Ele sînt totuși semnificative privind amploarea contribuției umane la modificarea stării normale a atmosferei, a solului și a oceanelor* (fig. 324).

Cantitatea de compuși ai sulfului intrată în atmosferă este apreciată la $550 \times 10^6$ tone/an, din care aproximativ $150 \times 10^6$ tone/an reprezintă contribuția omului, sub formă de $SO_2$ și $H_2S$. Pentru anul 2000 se apreciază o creștere a cantității la $275 \times 10^6$ tone $SO_2$/an, din care 93,5% ar fi produs în emisferă nordică și 6,5% în cea sudică.

Studiul demonstrează, de asemenea, că cei mai mulți compuși ai sulfului din atmosferă provin din arderea combustibililor fosili, din descompunerea și combustia substanțelor organice, din sărurile oceanelor și din vulcani. Ei sînt transportați și amestecați în atmosferă de curenții de aer și, după o perioadă de timp, redepuși pe sol sau în oceane. Atmosfera reprezintă, în acest proces, principalul vehicul al compușilor sulfului de la un loc la altul.

Monticello și Finnerty (1985), sintetizînd datele din literatură, arată că, spre exemplu, cărbunii conțin compuși ai sulfului în cantități ce variază între 0,5 și 11%, sub forma unor complexe organice sau anorganice (sulfuri de Pb, Fe, Zn, Cu sau sub formă de $CaSO_4 \cdot H_2O$) și numai foarte rar ca S° · $Fe_2S$ este prezentă cel mai des sub forma unor incluziuni diseminate, cu diametrul de 1,0—50 μm și mai rar ca noduli sau benzi. Țițeiul brut are un conținut global în sulf, variind în funcție de sursă, între 0,025 și 5%, reprezentat de > 200 compuși organici și anorganici ai acestui element.

Compușii organici în diferitele fracțiuni ale țițeiului brut cresc în general, după secvența: compuși saturați < compuși aromatici < rășini ≤ asfaltene.

Compușii anorganici sînt reprezentați de S°, sulfați, sulfiți, tiosulfați și sulfuri.

Sursa principală a sulfului din țiței este reprezentată de materia-mamă. Algele și reziduurile organice conțin 0,8% sulf. Există și excepții în cazul unor alge brune din Oceanul Pacific, care conțin pînă la 13% sulf. Aceste variații ar putea explica diferențele mari în concentrația în sulf a țițeiului cu diferite proveniențe. O sursă adițională este reprezentată de sulfații și sulfurile depuse în momentul formării acestora, respectiv al evaporării apei de mare.

Rocile pot conține între 9 și 23% sulf.

În sfîrșit, unele surse de gaze naturale pot conține pînă la 45% compuși ai sulfului.

---

* În acest studiu, suprafața Terrei a fost apreciată la $5,1 \times 10^{18}$ cm², iar cea a uscatului la $1,4 \times 10^{18}$ cm². În emisfera de nord, suprafața uscatului este de două ori mai mare decît în cea de sud.

După Kellogg și colab. (1977), cea mai mare parte a sulfului eliberat în atmosferă (70%) ar proveni din arderea cărbunilor. S-ar adăuga compușii acestuia proveniți din combustia petrolului (16%), din emisiunile de la rafinăriile de petrol, din industria chimică, din descompunerile anaerobe ale substanțelor și deșeurilor organice.

O cantitate aproximativ egală cu cea dispersată în atmosferă (580 × × $10^6$ tone/an) de compuși ai sulfului revine pe sol și în oceane. Din acestea, aproximativ 381 × $10^6$ tone/an ar fi depuse în emisfera nordică : 253 × × $10^6$ tone pe uscat și 128 × $10^6$ în oceane. În emisfera sudică ar fi depuse numai 169 × $10^6$ tone/an, din care 84 × $10^6$ pe uscat și 85 × $10^6$ în oceane.

Îndepărtarea sulfaților din atmosferă s-ar realiza prin procese care au loc la nivelul norilor („Rain-out"), în proporție de aproximativ 30%, iar restul de 70% prin precipitare în zone ale atmosferei inferioare norilor („Wash-out"), precum și prin acțiunea curenților care acționează pe suprafața Terrei sau aproape de aceasta. Timpul de rezidență a particulelor de sulfat în aerul de deasupra solului și în nori este apreciat ca fiind de cîteva zile și respectiv de o săptămînă. În stratosferă ar fi de 1—2 ani. Cu toate limitele datelor de acest gen, figura 325 este sugestivă pentru dinamica circulației

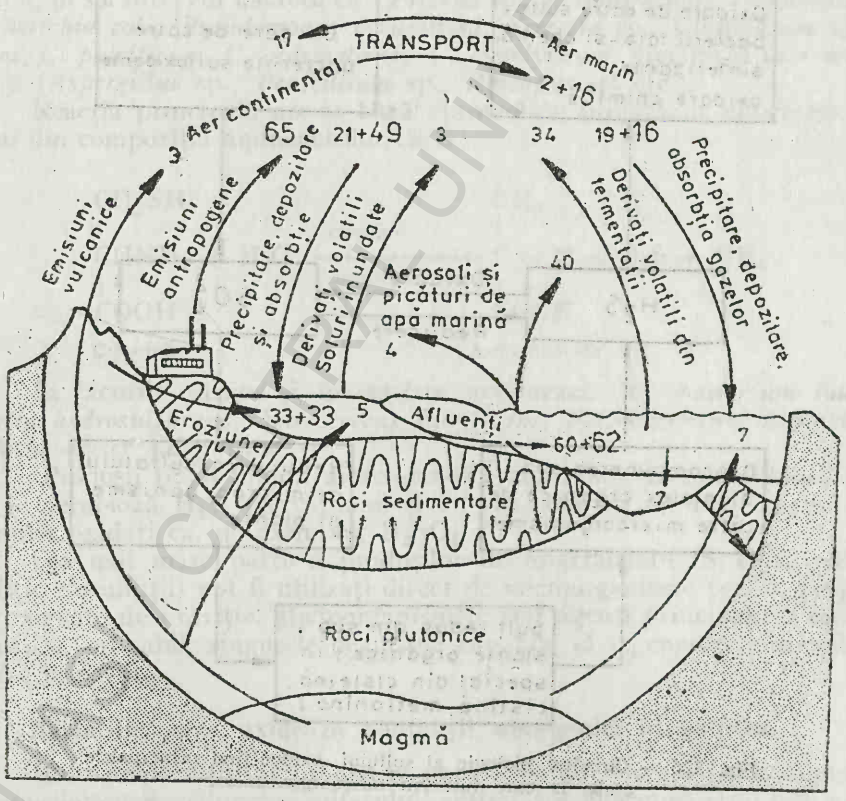



Fig. 325. — Ciclul biogeochimic al sulfului, marcînd estimări cantitative exprimate în $10^6$ tone/an: Cifrele cu caractere mari corespund perturbărilor antropogene, iar cele cu caractere mici indică importanța transferului înainte de intervenția omului (după Granat, Rodhe și Hallberg, 1976).

compușilor sulfului în ciclul biogeochimic înainte și după intervenția perturbatoare a omului.

Ciclul biologic al sulfului în natură implică participarea a patru tipuri de reacții :

1) Mineralizarea compușilor organici ai sulfului din constituția celulelor.

2) Oxidarea compușilor anorganici și din aminoacizi.

3) Asimilarea compușilor anorganici și încorporarea lor în organismele vii.

4) Reducerea sulfatului și a sulfului elementar la sulfuri (reducerea dezasimilatorie și asimilatorie a sulfatului).

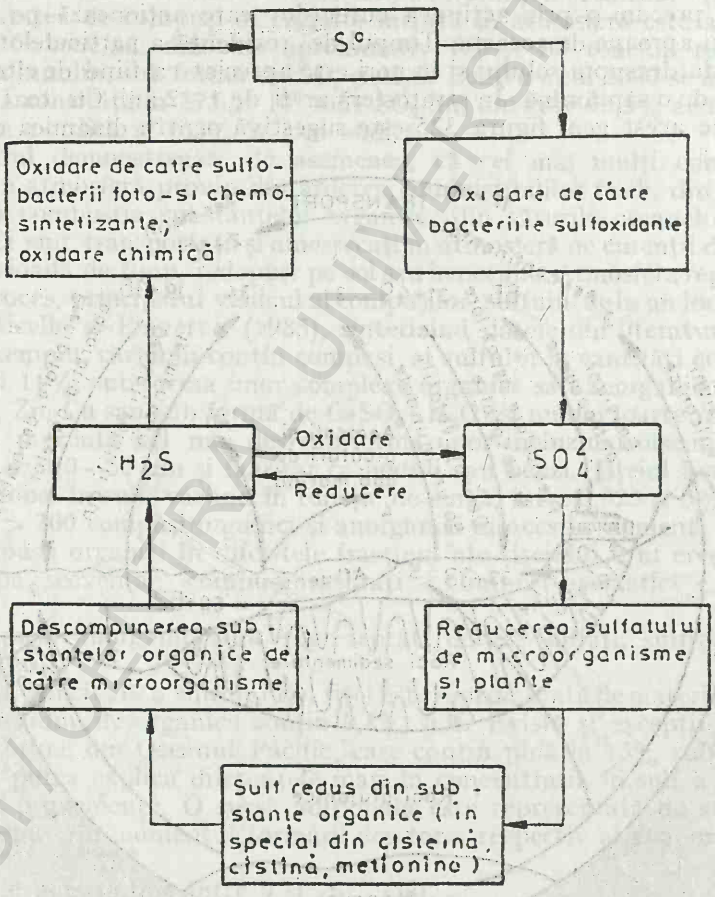



Fig. 326. — Circuitul biologic al sulfului, evidențiind principalele etape în care intervin microorganismele.

Figura 326 prezintă sintetic *ciclul biologic* al sulfului. Din ea rezultă că sulfatul ($SO_4^{2-}$) este redus la $H_2S$ și alte sulfuri de către bacteriile sulfat-reducătoare dezasimilatoare. Ele furnizează bacteriilor sulfoxidante sub-

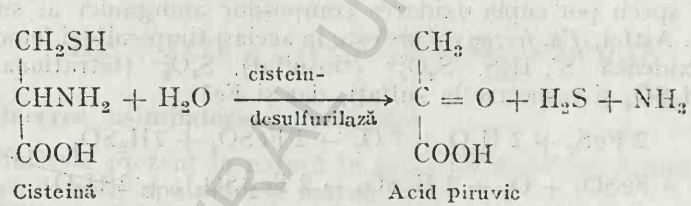
stratul pe care acestea îl convertesc, pe calea sulfului elementar, din nou la sulfat. În reducerea asimilatorie a sulfatului, S din sulfat trece prin stadiul de sulfură și este încorporat în structura aminoacizilor și a altor compuși cu sulf din compoziția organismelor. După moartea acestora, sulful se reîntoarce în stadiul de sulfuri în urma proceselor de degradare (putrefacția țesuturilor moarte) efectuate de microorganisme.

Ciclul biologic al sulfului în natură se integrează unui circuit geochimic. Acesta implică o serie de procese pur chimice ce determină recircularea sulfului sau a compușilor săi derivați din arderea combustibililor fosili, din emanații vulcanice, din dizolvarea compușilor solubili în râuri și ploaie, din reținerea sau eliberarea din sol pe bază de schimb ionic etc. (fig. 324).

## MINERALIZAREA COMPUȘILOR ORGANICI AI SULFULUI

Compușii organici ai sulfului depuși în sol, odată cu dejecțiile organismelor animale și, mai ales, cu țesuturile vegetale și animale moarte, nu pot fi utilizați ca atare de plantele superioare. Mineralizarea lor este realizată prin acțiunea directă a unor microorganisme nespecializate, de putrefacție. Astfel, în sol intervin bacterii ca : *Proteus* sp., *P. liquefaciens*, *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp., *Clostridium sporogenes*, *C. putrificum*, *C. oedematiens*, *C. histolyticum*, precum și unii microfungi (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. etc.).

Reacția principală are la bază proteoliza urmată de eliberarea sulfului din compoziția aminoacizilor cu S :




Cisteină — Acid piruvic

În lacurile sărate și în estuare acționează *Mycobacterium luteum*, *Vibrio hydrosulfurans*, *Micrococcus nitrificans*, *Flavobacterium halophilum*, *Achromobacter halophilum*.

Produșii finali majori ai acestei degradări sînt, în anaerobioză $H_2S$, iar în aerobioză $H_2S$, mercaptanii și diferiți compuși minerali parțial sau complet oxidați ca, de exemplu, $H_2SO_4$.

Cea mai mare parte a produșilor de mineralizare (S, $H_2S$, sulfații, sulfiții, tiosulfații) pot fi utilizați direct de microorganisme pentru propriile lor exigențe de nutriție. Microorganismele sînt agenți principali ai mineralizării și, probabil, singurele ogranisme capabile să regenereze rezervele de sulfat în natură.

### Bacteriile care oxidează compușii anorganici ai sulfului

Hidrogenul sulfurat produs în natură pe diferite căi (descompunerea compușilor cu S, reducerea sulfatului, activitatea vulcanică etc.) este numai în mică măsură imobilizat ca sulfuri instabile sau oxidat spontan la S° în prezența $O_2$. Cea mai mare parte a $H_2S$, ca și a sulfului elementar sînt oxidate pe cale biologică.

Bacteriile sulfoxidante formează un grup relativ mare de microorganisme aparținînd la 11 genuri (Kuenen și Tuovinen, 1981), cu rol esențial în circuitul biologic al acestui element. Ele aparțin la trei categorii majore:

1) Primul grup și cel mai studiat este reprezentat de bacteriile din genul *Thiobacillus* cu speciile : *T. thiooxidans*, *T. thioparus*, *T. denitrificans*, *T. ferrooxidans*, *T. novellus*, *T. intermedius*, precum și de genurile *Thiomicrospira* și *Sulfolobus*. Sînt microorganisme prezente în medii bogate în S și $H_2S$, cu predilecție în bazinele acvatice, lacuri, bălți, mări și oceane, precum și în apa de canal, izvoare termale acide, efluenți de drenaj ai minelor. Prezența lor în sol este controlată de o serie de interacțiuni complexe, fizice, chimice și biologice. În mediile acvatice se găsesc, de regulă, la granița dintre aerobioză și anaerobioză, deoarece au nevoie de existența simultană a compușilor reduși ai sulfului și a oxigenului sau nitraților.

Oxidează sulful elementar și diferiți compuși anorganici ai acestuia după reacțiile :

*Th. thiooxidans* : $2S^\circ + 3\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,H_2SO_4$

*Th. thioparus* : $H_2S + 2\,O_2 \rightarrow H_2SO_4$

$$Na_2S_2O_3 + 2\,O_2 + H_2O \rightarrow Na_2SO_4 + H_2SO_4$$

$$2\,Na_2S_4O_6 + 7\,O_2 + 6\,H_2O \rightarrow 2\,Na_2SO_4 + 6\,H_2SO_4$$

Oxidarea sulfului la sulfat este însoțită de o producere masivă de $H^+$ (*Th. thiooxidans* acidifică mediul și se dezvoltă la pH 1,0).

Unele specii pot cupla oxidarea compușilor anorganici ai sulfului cu alte procese. Astfel, *Th. ferrooxidans* este în același timp sulf- și ferooxidantă, deoarece oxidează $S^\circ$, $H_2S$, $S_2O_3^{2-}$ (tiosulfat), $S_4O_6^{2-}$ (tetrationat), $SO_3^{2-}$ (sulfit) la $H_2SO_4$ și respectiv la sulfați, dar și $Fe^{3+}$ :

$$2\,FeS_2 + 2\,H_2O + 7\,O_2 \rightarrow 2\,FeSO_4 + 2H_2SO_4$$

$$4\,FeSO_4 + O_2 + 2\,H_2SO_4 \rightarrow 2\,Fe_2(SO_4)_3 + 2\,H_2O$$

De asemenea, *Th. denitrificans*, bacterie facultativ anaerobă, este sulfoxidantă și denitrificatoare.

În aerobioză oxidează $S^\circ$, $H_2S$ și $Na_2S_2O_3$, iar în anaerobioză utilizează nitrații, după reacțiile :

$$8\,KNO_3 + 5\,H_2S \rightarrow 4\,K_2SO_4 + H_2SO_4 + 4\,N_2 + 4\,H_2O$$

$$8\,NaNO_3 + 5\,Na_2S_2O_3 + H_2O \rightarrow 9\,Na_2SO_4 + H_2SO_4 + 4N_2$$

$$6\,KNO_3 + 5\,S^\circ + 2\,H_2O \rightarrow 3\,K_2SO_4 + 2\,H_2SO_4 + 3\,N_2$$

2) Al doilea grup de bacterii sulfoxidante, diferențiat de cel anterior, în special pe criterii morfologice sau indirecte, este reprezentat de bacteriile din genurile : *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, *Thiovulum*, *Achromatium* ș.a. Cele mai multe nu au fost izolate în culturi în stare pură. Sînt prezente în medii care conțin $H_2S$ și $O_2$. Au fost izolate, în special, din mediile acvatice, care conțin $H_2S$ dizolvat de origine biologică sau geochimică ca bălți, apa de mare, ape poluate, în care se dezvoltă la interfața aer/apă sau aproape de aceasta. *Beggiatoa* oxidează $S^\circ$, $H_2S$ și sulfurile.

Reacția majoră în mediile bogate în $H_2S$ este următoarea :

$$2\ H_2S + O_2 \rightleftharpoons 2\ S^\circ + 2\ H_2O$$

Sulful elementar este depus în celule sub forma unor granulații refringente. Reacția este reversibilă : cînd $H_2S$ din mediu este epuizat, sulful stocat în incluziuni este folosit și oxidat la $H_2SO_4$.

3) Al treilea grup de bacterii sulfoxidante este reprezentat de bacteriile fotosintetizante sulfuroase. Ele aparțin la două categorii distincte :

a) Bacteriile sulfuroase purpurii (*Thiorhodaceae*) aparțin la două subgrupuri, care se deosebesc în funcție de modul în care depun incluziunile de S° : *Ectothiorhodospira* depune sulful extracelular, iar *Thiospirilum, Thiocystis, Thiocapsa, Chromatium, Lamprocystis* și *Rhodothecae* depun sulful intracelular.

b) Bacteriile sulfuroase verzi — *Chlorobiaceae* (*Chlorobium, Chloropseudomonas, Pelodictyon*) utilizează $H_2SO_4$ ca donator de electroni pentru reducerea $CO_2$. Sulful format ca intermediar în oxidarea sulfurilor la sulfat este totdeauna depus în afara celulelor.

Bacteriile fototrofe purpurii și verzi sînt microorganisme acvatice, prezente în apele dulci și marine, în apele izvoarelor sulfuroase naturale, care conțin $H_2S$ dizolvat sau alți compuși cu sulf, în condiții de anaerobioză și iluminare adecvată. Ele utilizează compuși ai sulfului ca $H_2S$, $S_2O_3^{2-}$, $SO_3^{2-}$, iar unele chiar compuși organici. Energia stocată ca rezultat al fotosintezei este folosită pentru sinteză de constituenți celulari de la $CO_2$ după reacția :

$$H_2S + 2\ CO_2 + 2\ H_2O \xrightarrow{\text{lumină}} H_2SO_4 + 2(CH_2O)$$

### Reducerea asimilatorie a sulfaților

Sulful este prezent în natură în cantități mari sub formă oxidată ca sulfați în sol, roci, apă dulci și marine etc.

Mobilizarea lui, în vederea utilizării în biosinteze, se realizează printr-un proces de reducere biologică cu importanță critică pentru viața plantei. El este efectuat în exclusivitate de bacterii, de unele levuri și de plante, și niciodată de organismele animale. Sulfații pot satisface atît nevoile de sulf redus, cît și pe cele de sulf oxidat necesar pentru creșterea organismelor capabile să-i folosească (Roy și Trudinger, 1970 ; Peck jr., 1974).

Reducerea asimilatorie a sulfatului este o cale biosintetică supusă unei reglări fine, datorită căreia, cele mai multe organisme, reduc numai cantitățile de sulf necesare pentru satisfacerea nevoilor nutriționale. Produsul finalcheie al acestui proces este cisteina de la a cărui grupare — SH sînt derivați ceilalți aminoacizi cu sulf, precum și biotina, tiamina, acidul pantotenic, glutationul ș.a.

Asimilarea reductivă a sulfaților este efectuată de o gamă largă de bacterii nespecializate. Cele mai studiate sînt : *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas* sp., *Nitrobacter.*

Proces biochimic deosebit de complex, încă incomplet elucidat, s-ar realiza în următoarea succesiune de reacții :

1) Sulfat (din mediul extern) $\xrightarrow{\text{transport activ}}$ sulfat (intracelular).

2) Sulfat + ATP $\xrightarrow{\text{ATP sulfurilază}}$ adenozin-5'-fosfosulfat (APS) + PPi

3) APS + ATP $\xrightarrow{\text{APS fosfokinază}}$ adenozin-3'-fosfat-5'-fosfosulfat (PAPS) + ADP

4) PAPS + 2 RSH (tioredoxină) $\xrightarrow{\text{PAPS reductază}}$ sulfit + + AMP-3'-fosfat + RSSR

5) Sulfit + 3NADPH+3H$^+$ $\xrightarrow{\text{sulfit reductază}}$ $H_2S$ + 3 NADP$^+$

$H_2S$ a cărui acumulare ar fi toxică este încorporat imediat de O-acetil-L-serină după reacția :

6) $H_2S$ + O-acetil-L-serină $\xrightarrow[\text{sulfhidrilază}]{\text{O-acetil-}}$ L-cisteină + acetat + $H_2O$

**Reducerea dezasimilatorie a sulfaților**

**„Bacteriile sulfatreducătoare formează un grup de microorganisme bizare, despre care, cei mai mulți oameni, inclusiv mulți microbiologi, nu știu nimic".**

J. R. POSTGATE

Spre deosebire de reducerea asimilatorie a sulfaților, care asigură utizarea acestui compus în biosinteză, pentru formarea unor constituenți celulari, reducerea dezasimilatorie realizează folosirea lui ca acceptor final de electroni în procese de dezasimilare a unor substraturi organice și în respirația anaerobă. Procesul a fost numit, din această cauză, și *respirația sulfatului*. În acest caz, numai o cantitate infimă din sulfatul redus este asimilat de organism, imensa majoritate fiind eliberat în mediul extern ca ($S^{2-}$), sau ca $H_2S$ liber.

Postgate (1979) exemplifică această deosebire citînd cazul bacteriei *Klebsiella aerogenes*, care asimilînd sulfatul produce 200 mg biomasă celulară (greutate uscată) per mg sulfat asimilat. În condiții similare, bacteriile sulfatreducătoare (*Desulfovibrio*) formează, în funcție de sursa de carbon, numai 0,5—1 mg (greutate uscată) per mg sulfat asimilat.

Bacteriile sulfat reducătoare aparțin la trei genuri :

1) *Desulfovibrio* cu speciile : *D. desulfuricans, D. gigas, D. africanus, D. vulgaris, D. salexigenes, D. rubentschickii* ;

2) *Desulfotomaculum* cu speciile : *D. acetooxidans, D. nigrificans, D. ruminis, D. orientis* ;

3) *Desulfomonas pigra*.

Sînt toate strict anaerobe și foarte larg răspîndite în mediile terestre în care au loc procese microbiene de descompunere a unor substrate organice de natură vegetală sau animală, în solurile saturate cu apă, în mlaștini, în lacuri saline și hipersaline, în nămol, în mări și oceane, în izvoarele sulfu-

roase, în regiunile geotermale, în mine de sulf, în sondele de țiței, în zăcămintele de gaz metan și de sulf, precum și în rumen și intestinul unor insecte etc.

Au o mare capacitate de supraviețuire în mediile terestre și acvatice, rezistînd frecvent la condițiile extreme.

Cele mai multe sînt mezofile (temperatura optimă 25—40°C). Unele cresc bine la —5°C, altele la 75°C.

Toleranța la sare este, de asemenea, foarte mare (30 % NaCl) în special pentru speciile (*Desulfovibrio vulgaris* subsp. *aestuarii*, *D. salexigenes*) care trăiesc în lacurile sărate, oceane, sedimente marine. Toleranța la sare este influențată de temperatură, pH, presiunea hidrostatică, compoziția chimică a mediului etc.

Bacteriile sulfatreducătoare tolerează, de asemenea, presiuni hidrostatice ridicate. Au fost izolate din sonde de țiței de la adîncimi de 2000 și 4000 m, precum și din sedimente marine situate la 7000 — 10 000 m. La presiuni ridicate (1 000 atm) se dezvoltă chiar la 104°C.

### Biochimia reducerii dezasimilatorie a sulfaților

După cum remarcă ZoBell (1963), există diferențe sensibile între diferitele specii, legate, în mare măsură, de condițiile particulare ale mediului.

Hidrogenul necesar pentru reacție poate fi furnizat de compuși organici, ca lactatul, după reacția:

$$2\ C_3H_5O_3Na + MgSO_4 \rightarrow H_2S + 2\ C_3H_3O_2Na + MgCO_3 + CO_2 + H_2O$$

sau de hidrogenul molecular, în cazul reducătorilor de sulfat autotrofi. Principalele reacții biochimice descifrate sînt următoarele:

$$4\ H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-} + 4H_2O$$
$$3\ H_2 + SO_3^{2-} \rightarrow S^{2-} + 3\ H_2O$$
$$4\ H_2 + S_2O_3^{2-} \rightarrow S^{2-} + H_2S + 3\ H_2O$$
$$9\ H_2 + S_4O_6^{2-} \rightarrow S^{2-} + 3\ H_2S + 6\ H_2O$$
$$4\ H_2 + CaSO_4 \rightarrow H_2S + Ca(OH)_2 + 2\ H_2O$$

Bacteriile sulfatreducătoare reprezintă principalul producător de $H_2S$ în natură. Numărul lor este maxim în stratul de suprafață al sedimentelor de nămol și variază în funcție de natura bazinului acvatic. El variază între 10 celule/ml în apele dulci oligotrofe, $0{,}5 \times 10^3 - 0{,}5 \times 10^6$/ml în apele mezotrofe și $3 \times 10^5$ celule/ml în lacurile eutrofe. În nămolul unor lacuri sărate eutrofizate, acest număr poate ajunge pînă la 10 milioane celule/ml.

## CICLUL SULFULUI ÎN MEDIILE ACVATICE

Prezent în toate mediile acvatice naturale, ciclul sulfului are cantitativ o importanță majoră în apa oceanelor, datorită conținutului mare în sulfați (2,65 mg $SO_4^{2-}$/g/$H_2O$ al acesteia), precum și în lacurile acide sau bogat mineralizate, închise. Acestea conțin, de asemenea, cantități importante de sulfați proveniți din dizolvarea rocilor sau derivați din $SO_2$ atmosferic.

Mecanismele biochimice și grupurile fiziologice de microorganisme participante sînt în linii mari aceleași.

În apele dulci, în care conținutul în ioni sulfat este relativ mic, producerea de $H_2S$ se realizează, în special, pe calea descompunerii substanțelor organice cu S. În general, însă, în apele aerate, $H_2S$ este oxidat rapid.

În straturile profunde și în nămol, principala sursă de $H_2S$ care se acumulează în sediment este reprezentată de bacteriile sulfatreducătoare strict anaerobe. $H_2S$ din nămol interacționează cu ionii feroși, producînd FeS, care este insolubilă și depusă ca atare, determinînd culoarea neagră a nămolului. Excedentul de $H_2S$ este oxidat de bacterii. Figura 327 reprezintă schematic procesele biochimice determinate de microorganismele implicate în circulația sulfului în lacuri.

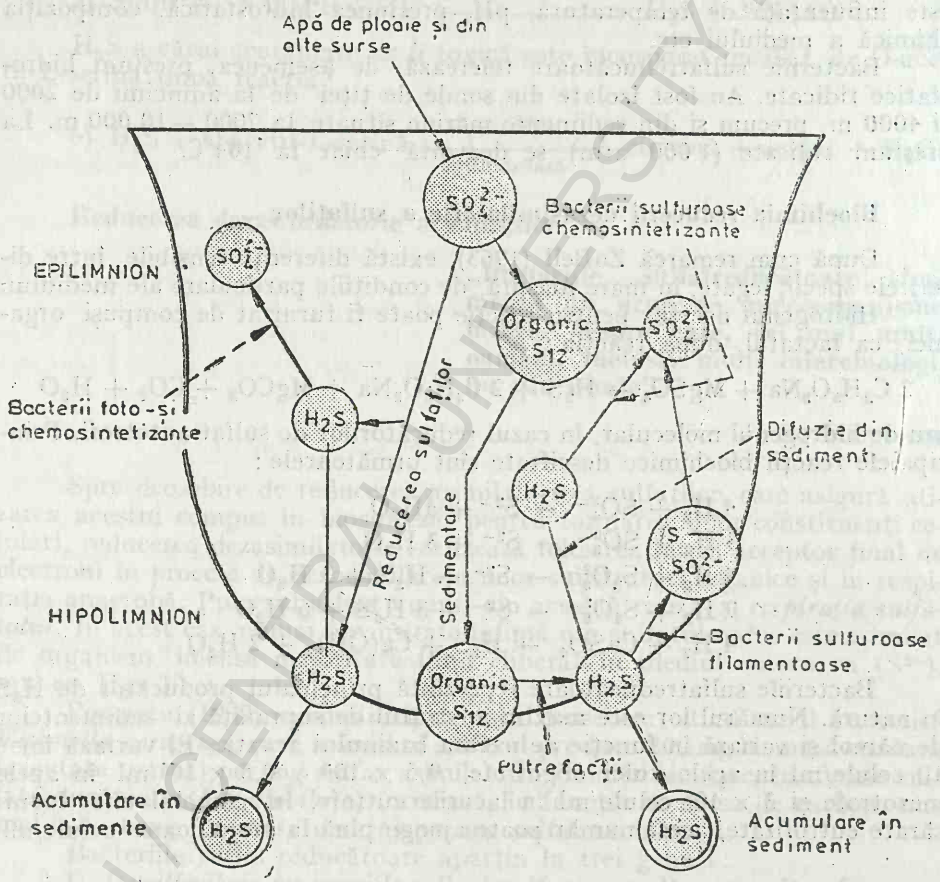



Fig. 327. — Reprezentarea schematică a proceselor microbiene implicate în circulația sulfului în lacuri (după Kuznetsov, 1970).

În mediul marin după Sorokin (1964), procesele decurg după o schemă asemănătoare. Utilizînd $^{35}SO_4^{2-}$ și măsurînd radioactivitatea $H_2S$ produs, el a demonstrat că reducerea sulfatului are loc în două regiuni distincte (fig. 328):

1) Prima, situată la adîncimea de 200—300 m, corespunde unei regiuni mai aerobe. Substanțele organice mai ușor oxidabile formate în zona eu-

fotică sînt atacate în această regiune, utilizînd sulfatul ca acceptor de electroni.

2) Substanțele mai puțin oxidabile, care scapă acestui atac, se depun la fund (la aproximativ 1 600 m, în cazul stațiunii 4 745 studiate), unde se acumulează, servind, în continuare, ca sursă de energie pentru reducerea sulfatului.

Un caz particular este reprezentat de Marea Neagră, mare aproape închisă, și cu caracter stagnant, din cauza lipsei curenților verticali. Datorită aportului masiv de apă dulce al marilor fluvii afluente, straturile superioare (pînă la 200 m) conțin ape mai dulci, care se scurg prin strîmtoarea Bosfor în Marea Mediterană. În același timp, pe aceeași cale, din Mediterana pătrund în straturile inferioare ape mai sărate, și deci mai grele, care împiedică formarea curenților verticali.

Consecința majoră este că în timp ce la 200 m $H_2S$ ajunge la o concentrație de 0,1 ml/l, în regiunea de fund ajunge la 5 ml/l, împiedicînd orice formă de viață, cu excepția microorganismelor (Botnariuc și Vădineanu, 1982). După unele date reunite, aproximativ 90% din volumul apei din Marea Neagră, estimat la două miliarde de tone, este neaerat și conține cantități importante de $H_2S$. Purificarea ei ar putea produce 1,3 miliarde tone de sulf, 0,1 miliarde tone $H_2$ și 7,6 miliarde tone de gaze.

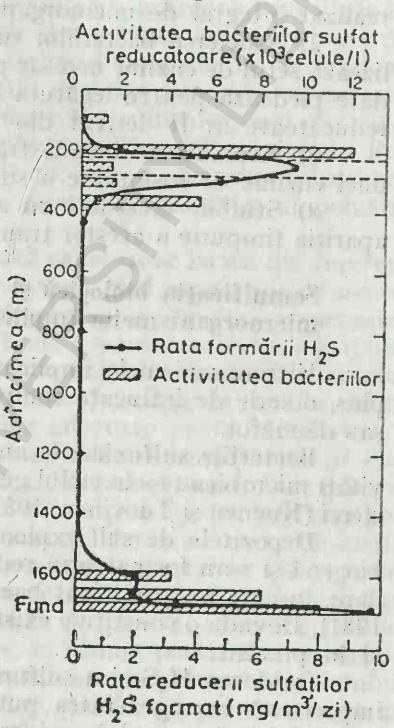



Fig. 328. — Rata reducerii sulfaților în coloana de apă în Marea Neagră, determinată prin utilizarea sulfatului marcat cu $^{35}S$ (după Sorokin, 1964).

Botnariuc și Vădineanu (1982) citează un alt efect negativ al acumulării $H_2S$, reprezentat de cazul unor zone răsăritene din Delta Dunării în care dezvoltarea masivă a plaurului * împiedică oxigenarea apelor și degajarea $H_2S$ spre suprafață, determinînd acumularea lui. În aceste condiții se dezvoltă intens doar bacteriile sulfatreducătoare. Cînd apele încep să scadă, apa de sub plaur se scurge parțial prin gîrle, cărora le conferă un miros dezagreabil provenit de la $H_2S$ acumulat (spre exemplu, gîrla Împuțita de lîngă Sulina).

## Aspecte evolutive

Capacitatea de a utiliza compuși anorganici reduși ai sulfului ca donatori de electroni în respirație sau de a reduce compușii anorganici oxidați ca acceptori terminali de electroni reprezintă o caracteristică metabolică

* *Plaur* — împletituri groase (adesea peste 1 m) de rizomi de stuf, rădăcini ale diferitelor plante, nămol și detritus (Botnariuc și Vădineanu, 1982).

primitivă. Ca atare, metabolismul anorganic al sulfului, în general, poate fi considerat ca o caracteristică fiziologică primitivă (Peck jr., 1974), cu un rol esenţial în supravieţuirea primelor forme de viaţă.

În sprijinul acestei concepţii sînt aduse următoarele argumente :

1) Ciclul sulfului în natură este cel mai simplu ciclu anorganic şi este realizat integral de microorganisme.

2) Asocierea bacteriilor sulfatreducătoare cu cele fotosintetizante realizează setul de enzime necesar pentru transformarea ciclică a sulfului. Unele date pledează pentru legătura lor evolutivă, în sensul că bacteriile sulfatreducătoare ar fi derivat din cele fotosintetizante.

3) Reprezintă singura transformare anorganică ce include apariţia unei enzime de fosforilare a substratului.

4) Studiile efectuate cu ajutorul izotopilor radioactivi demonstrează apariţia timpurie a acestor transformări în cursul evoluţiei.

### Semnificaţia biologică şi consecinţele practice ale activităţii microorganismelor implicate în ciclul sulfului în natură

Microorganismele implicate în ciclul sulfului în natură exercită, în plus, o serie de influenţe complexe şi determină efecte cu caracter benefic sau dăunător.

**Bacteriile sulfoxidante** au avut un rol important — alături de alte activităţi microbiene — în ciclul geochimic al acestui element şi în evoluţia biosferei (Kuenen şi Tuovinen, 1981).

Depozitele de sulf exploatate în prezent au cel mai adesea o origine biogenă şi s-au format prin reducerea sulfaţilor, urmată de o etapă de oxidare, în care au participat bacteriile sulfooxidante (La Riviere şi Schmidt, 1981). Dovada o constituie existenţa sulfuretelor în care sulful se acumulează şi în prezent.

Oxidarea $H_2S$ şi a sulfurilor, în general, la sulfat reprezintă o etapă importantă în regenerarea puterii oxidative în bazinele acvatice, în care sulfatul joacă un rol în mineralizarea anaerobă.

În apele deschise, marine şi oceanice, bacteriile sulfoxidante oxidează compuşii volatili ai sulfului eliberaţi din sedimente în cursul descompunerii unora din constituenţii acestora. Între activităţile importante ale bacteriilor sulfoxidante sînt de amintit, în principal următoarele :

1) Au un rol important în reglarea cantitativă a emanaţiilor de $H_2S$ produs pe cale biologică.

2) Au importanţă pentru agricultură, deoarece solubilizează compuşii sulfului din sol, făcîndu-i disponibili sub formă de sulfaţi pentru a fi asimilaţi de microorganisme şi de plante. Prin oxidarea $H_2S$, *Beggiatoa* poate asigura detoxifierea solurilor inundate din orezării. Producerea de acid sulfuric de către *Thiobacillus* are, în anumite limite, un efect benefic pentru sol, deoarece dizolvă mineralele, altfel inaccesibile plantelor pentru creştere şi eliberează fosforul din rocile fosfatice.

3) Participă în procesele de coroziune ale conductelor şi altor structuri metalice, precum şi ale betoanelor în special submerse. Această proprietate este exploatată în biometalurgie pentru „leşierea" („leaching") metalelor neferoase din zăcămintele sărace şi din depozitele de steril.

4) Contribuie la poluarea mediului cu acizi şi metale, acţionînd asupra diferitelor materiale reziduale (Tuovinen şi Kelly, 1972).

**Bacteriile sulfatreducătoare** au o mare varietate de efecte ecologice, economice și industriale prin capacitatea lor de a produce mari cantități de $H_2S$, prin larga răspîndire în mediile terestre și acvatice anaerobe și prin capacitatea de a rezista la condiții extreme de temperatură, salinitate și presiune.

**Rolul în poluarea mediului.** Bacteriile sulfatreducătoare dezvoltate în apele de canal, în apele stagnante și în cele din porturi intens poluate de activitățile umane sînt răspunzătoare de mirosul dezagreabil determinat de producerea masivă de $H_2S$. În aceste medii devenite anaerobe, ca urmare a creșterii nevoii de $O_2$, are loc o reducere masivă a sulfaților, mai ales cînd numărul bacteriilor sulfatreducătoare depășește $10^4$ — $10^6$ celule/ml. Reducerea masivă a sulfaților în natură rezultă totdeauna din activitatea bacteriilor sulfatreducătoare și este evidentă în stadiul penultim al poluării organice masive a mediului.

În acest context, Postgate (1987) citează cazul unor lacuri din ținuturi împădurite. Apele acestora sînt bine oxigenate vara, cînd populațiile de microorganisme sînt limitate la un număr mic de alge și de bacterii comensale. Căderea masivă a frunzelor toamna adaugă brusc o mare cantitate de materie organică. Ea determină o creștere rapidă a numărului bacteriilor aerobe și o epuizare a $O_2$ dizolvat. În consecință, microorganismele aerobe mor, mărind gradul de poluare și creînd condițiile adecvate pentru „înflorirea" denitrificatorilor facultativ anaerobi, pînă cînd sînt epuizați nitrații din mediu. În continuare, se dezvoltă bacteriile sulfatreducătoare, care măresc gradul de poluare prin $H_2S$ produs. Reoxidarea $H_2S$ le poate prelungi perioada de activitate, dar, în general, în final, sulfații devin un factor limitant. În aceste condiții devin active bacteriile metanogene (anterior inhibate de prezența $H_2S$). Ele reprezintă faza ultimă în această succesiune biologică și sînt răspunzătoare de producerea caracteristică de gaze de mlaștină sau de baltă („Marsh gas") în sedimentele acvatice, în ultima perioadă a toamnei.

Bacteriile sulfatreducătoare sînt răspunzătoare de precipitarea fierului solubil din ape și din sol sub formă de sulfură (FeS) și depunerea acesteia sub forma unui strat de sulfură feroasă de culoare neagră pe suprafața sedimentelor și a nămolului.

În solurile în care fosfații sînt prezenți ca fosfați ferici, conversia lor la FeS poate avea un efect benefic de mărire a fertilității solului prin disponibilizarea fosforului pentru nutriția plantelor.

Între *efectele negative ale bacteriilor sulfatreducătoare* sînt de menționat și următoarele :

— Modificarea culorii unor medii acvatice, consecutiv dezvoltării bacteriilor sulfatreducătoare fototrofe, în sulfuretele în care „înfloresc" în special *Chromatium* și *Thiopedia*. Considerate în trecut ca miraculoase sau de origine divină, aceste transformări duc la colorarea în roșu viu a apelor infectate („lacuri de sînge" — „Lakes of blood" sau „mare însîngerată" — — „Bloody sea").

— Dezvoltarea masivă a bacteriilor sulfatreducătoare este asociată cu o mare mortalitate a peștilor și a altor organisme acvatice.

— Poluarea apei calde domestice și multiplicarea în sistemele de încălzire centrală a locuințelor și în sistemele închise industriale de răcire a apei.

— Coroziunea conductelor, blocarea apelor de injecție în sondele petrolifere, corodarea pompelor și a tancurilor de depozitare a țițeiului și a diferitelor instalații.

— Coroziunea construcțiilor din piatră.

— Atacarea structurii navelor acostate în danele portuare poluate.

— Înnegrirea vopselelor produse cu pigmenți pe bază de metale, ca și a picturilor și obiectelor de artă metalice, prin acțiunea $H_2S$ produs pe cale biogenă.

— Înnegrirea pastei de lemn în industria hîrtiei și pierderea luciului pieilor în tăbăcărie, prin precipitarea FeS.

— Contaminarea și alterarea alimentelor în special de bacteriile halofile cu apariția unui miros dezagreabil.

Între *aplicațiile practice* de perspectivă sînt de menționat și cele legate de posibilitatea exploatării unor procese analoge biogenezei naturale. Necesitatea acestei acțiuni decurge din faptul că rezervele mondiale de sulf sînt limitate și deși au fost descoperite depozite noi, epuizarea celor vechi este mai rapidă. După Postgate (1987), pe baza datelor lui Butlin și colab. (1960), se poate aprecia că o mare stație de prelucrare a apelor uzate ar putea furniza aproximativ 20 000 de tone de sulfuri pe zi. Aplicarea tehnologiilor de prelucrare a nămolurilor din toată Anglia (evident practic imposibilă) ar fi echivalentă cu $10^6$ tone de sulf/an (necesitățile actuale ale Angliei sînt apreciate la $2{,}5 \times 10^5$ tone/an).

## CIRCULAȚIA ELEMENTELOR TOXICE ÎN NATURĂ

**„Cunoștințele actuale asupra ciclului biologic al unor elemente toxice ne permit să prevedem comportamentul altor elemente toxice în mediu".**

J. M. Wood

În afară de elementele biogene (bioelemente), majore și minore, majoritatea celor înregistrate în sistemul periodic sînt biologic „inerte", în sensul că prezența sau absența lor nu determină nici un efect evident asupra sistemelor biologice. O altă categorie de elemente însă, poate exercita efecte inhibitorii asupra unor reacții enzimatice și, prin aceasta, pot produce efecte toxice grave asupra organismelor vegetale și animale (Heinen, 1974).

În funcție de capacitatea lor de a polua mediul extern, elementele toxice sînt clasificate de Wood (1974, 1976) în :

1) *Elemente inofensive* (necritice) : Na, K, Mg, Ca, H, O, N, C, P, Fe, S, Cl, Br, F, Li, Ru, Sr, Al, Si ;

2) *Elemente foarte toxice și relativ accesibile* : Be, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, As, Se, Te, Pal, An, Hg, Tl, Pb, Sb, Bi ;

3) *Elemente toxice, dar foarte insolubile sau foarte rare* : Ti, Hf, Zr, W, Ta, Ga, La, Os, Rh, Ir, Ru, Ba.

Microorganismele sînt frecvent expuse la concentrații variabile de substanțe toxice din mediu. Cel mai studiat este cazul metalelor grele și al compușilor lor. Aceste substanțe au două proveniențe :

1) Din anumite medii naturale, cum sînt solurile sau emanațiile vulcanice, în care caz ele circulă în natură fiind mobilizate printr-un geociclu de la care devin disponibile pentru plante și animale (fig. 329). Această sursă nu pune probleme speciale de poluare sau de sănătate, deoarece distribuția elementelor sau a compușilor lor toxici rămîne relativ constantă și la un nivel scăzut : procesele biologice naturale asigură o stare de echilibru între eliberare și distrugere sau neutralizare, prin formarea de compuși mai puțin toxici sau chiar inofensivi.

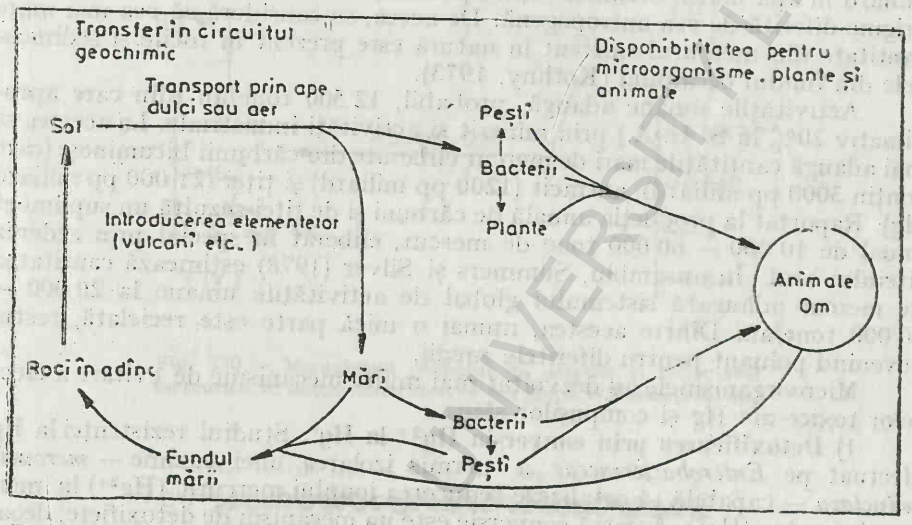



Fig. 329. — Reprezentarea schematică a deplasării elementelor toxice în ciclul biogeochimic și disponibilitatea lor pentru microorganisme, plante și animale (după Wood, 1974).

2) Poluarea cu compușii sintetizați industrial, ca rezultat al activității umane în societățile industrializate are un caracter grav pentru că influențează ciclurile geochimice și disponibilitatea elementelor respective pentru sistemele biologice. În general, această poluare are un caracter masiv, perturbă echilibrul natural, deoarece depășește ritmul de degradare. Unii compuși pot persista, acumulîndu-se în mediu, în lipsa unor sisteme biologice capabile să-i transporte sau să-i degradeze.

Frecvent, microorganismele se adaptează la aceste concentrații de compuși toxici, dezvoltînd, uneori, mecanisme importante de rezistență care includ :

1) Transformarea lor pe cale enzimatică (oxidări, reduceri, metilări, demetilări etc.) în forme chimice mai puțin toxice sau mult mai volatile decît compusul inițial. Mecanismul este activ în cazul $Hg^{2+}$, $As^{3+}$, $Cr^{6+}$ etc.

2) Modificarea capacității de înglobare și transport a unor metale toxice ($As^{5+}$, $Ag^{+}$, $Cd^{2+}$).

Aceste sisteme de rezistență au rolul de a proteja microorganismele într-un mediu impropriu, îndeplinind, în același timp, un rol important în circulația substanțelor toxice în biosferă. Ca regulă generală dacă microorganismele nu pot modifica anumite substanțe toxice este improbabil ca aceasta să poată fi făcută de organismele superioare (Wood, 1974).

## INTERCONVERSIUNILE MICROBIENE ALE METALELOR GRELE

Au fost studiate, în special în cazul Hg, unul din elementele cele mai poluante, datorită utilizărilor largi în societatea contemporană, în numeroase tehnologii moderne (ca atare sau sub formă de săruri), precum și ca fungicid, dezinfectant etc.

După Fitzgerald, Gordon jr. și Crauston (1974), cu ~ 0,15 părți per miliard în apa mării, oceanele reține aproximativ $2 \times 10^8$ tone de mercur cu origine diferită de cea antropogenă. De aceea, se consideră că cea mai mare cantitate din mercurul existent în natură este prezent în rocile și sedimentele din fundul oceanului (Kothny, 1973).

Activitățile umane adaugă, probabil, 12 500 tone/an (din care aproximativ 20% în S. U. A.) prin minerit și activități industriale. La acestea se mai adaugă cantitățile mari de mercur eliberate din cărbunii bituminoși (care conțin 3000 pp miliard), antracit (1200 pp miliard) și țiței (21 000 pp miliard Hg). Raportat la producția anuală de cărbuni și de țiței rezultă un supliment anual de 10 000 — 60 000 tone de mercur, eliberat în special prin arderea țițeiului brut. În ansamblu, Summers și Silver (1978) estimează cantitatea de mercur adăugată sistemului global de activitățile umane la 20 000 — 70 000 tone/an. Dintre acestea, numai o mică parte este reciclată, restul devenind poluant pentru diferitele medii.

Microorganismele au dezvoltat mai multe mecanisme de evitare a efectelor toxice ale Hg și compușilor săi :

1) **Detoxificarea prin conversia $Hg^{2+}$ la $Hg^{\circ}$.** Studiul rezistenței la Hg efectuat pe *Enterobacteriaceae* a permis izolarea unei enzime — *mercuric reductaza* — capabilă să catalizeze reducerea ionului mercuric ($Hg^{2+}$) la mercur elementar ($Hg^{\circ}$). Această conversie este un mecanism de detoxifiere, deoarece $Hg^{\circ}$ este mai puțin periculos, fiind volatil și, în consecință, eliminat din mediu sub formă de vapori, asigurînd depoluarea mediilor acvatice.

Mercuric reductaza este o enzimă cu structură de flavoproteină (conține FAD) cu configurație de mono-, di- sau trimer, în funcție de proveniență. Este activă în prezența cofactorului NADPH, acționînd după reacția globală :

$$Hg^{2+} + NADPH + H^{+} \rightleftharpoons Hg^{\circ} + 2\ H^{+} + NADP^{+}$$ (fig. 330).

Marshall, Booth și Williams (1984) au demonstrat bazele genetice ale acestui proces codificat de un operon de rezistență la Hg inductibil, situat în structura unei plasmide R* (fig. 331). Au fost identificate în structura lui, pe lîngă o regiune *Operator — Promotor* (OP), și o genă de reglare (*mer* R), patru gene structurale : *mer A* (codifică sinteza mercuric reductazei), *mer T* (rol în transportul Hg prin membrană), *mer C* (proteină periplasmică, avînd rolul de a prelua Hg din soluție și de a-l ceda proteinei Mer T sau de a acționa ca punte între proteina Mer T și enzima insolubilă intracelulară), și *mer D* (funcție necunoscută).

2) **Metilarea și dimetilarea Hg.** Un alt mecanism de detoxifiere, însă mai complicat, constă în conversia $Hg^{2+}$ la metil-Hg și dimetil-Hg. În natură, metilarea Hg este asociată cu sistemul răspunzător de producerea anaerobă a metanului. În acest proces, un rol esențial revine vitaminei $B_{12}$ sub formă

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 97.

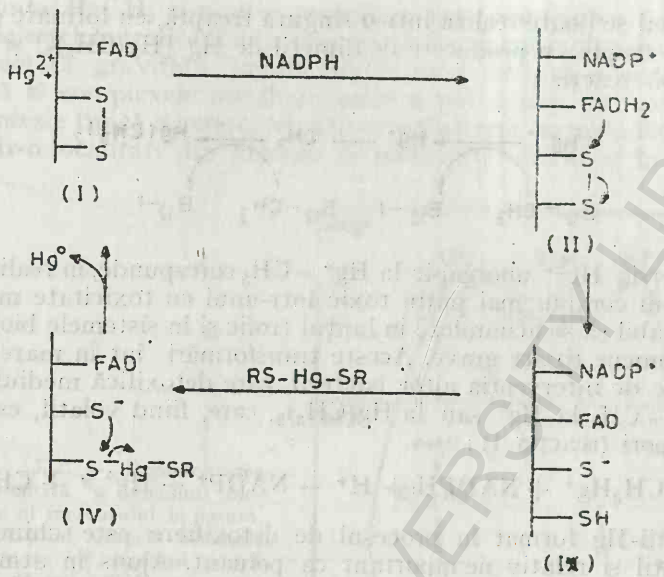



Fig. 330. — Mecanismul probabil de acțiune al reductazei mercurice în detoxifierea mercurului (după Williams și Silver, 1984).

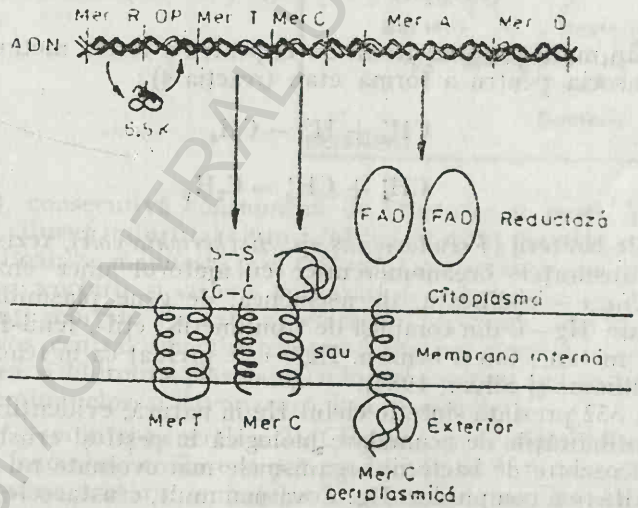
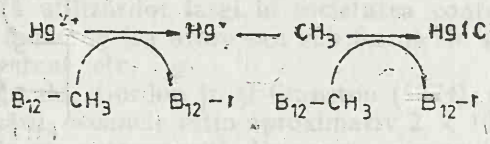



Fig. 331. — Model structural evidențiind funcționarea operonului care condiționează rezistența la mercur (după Williams și Silver, 1984).

de *metil-$B_{12}$*($CH_3$-$B_{12}$), sintetizată în sistemele biologice prin reacția vitaminei $B_{12}$ cu acidul N-metiltetrahidrofolic, bun transportor de grupări metil. După ce s-a format, metil-$B_{12}$ poate fixa gruparea $CH_3$ pe metale sau metaloide (As, Se), formînd compuși alchilați.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Procesul se poate realiza într-o singură treaptă, cu formare de Hg-$CH_3$ sau în două trepte cu producere de dimetil de Hg [$Hg(CH_3)_2$] și $B_{12}$ redusă ($B_{12}$-r), după reacția :




Conversia $Hg^{2+}$ anorganic la $Hg^+—CH_3$ corespunde, în realitate, transformării unui compus mai puțin toxic într-unul cu toxicitate mai mare și, în plus, capabil să se acumuleze în lanțul trofic și în sistemele biologice, producînd fenomene toxice grave. Aceste transformări sînt în mare parte contrabalansate de intervenția altor bacterii, care detoxifică mediul, prin conversia $Hg^+—CH_3$ la $Hg^\circ$ sau la $Hg(CH_3)_2$, care, fiind volatil, este eliminat faza de vapori (reacția 1) :

$$CH_3Hg^+ + NADPH + H^+ \rightarrow NADP^+ + Hg^\circ \nearrow + CH_4 \qquad (1)$$

Dimetil-Hg format în procesul de detoxifiere este chimic instabil, foarte volatil și relativ neimportant ca poluant. Ajuns în atmosferă este fotolizat, sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, pentru a forma $Hg^\circ$ și radicali metil ($CH_3^\cdot$) :

$$(CH_3)_2Hg \xrightarrow{h\nu} Hg^\circ + 2\ CH_3^\cdot \qquad (2)$$

Radicalii metil pot fixa atomi de H pentru a forma metan (reacția 3) sau se pot asocia pentru a forma etan (reacția 4) :

$$CH_3^\cdot + H^\circ \rightarrow CH_4 \qquad (3)$$

$$CH_3^\cdot + CH_3^\cdot \rightarrow C_2H_6 \qquad (4)$$

3) Unele bacterii (*Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*), rezistente la Hg, detoxifică substanțele organomercurice cu ajutorul unei enzime — *organomercuric liaza* — codificată, de asemenea, de gene plasmidiale. Ea clivează legătura Hg—C din compuși de tipul metil-, etil-, fenil-Hg, pentru a forma $Hg^{2+}$, metan, etan și benzen. $Hg^{2+}$ este preluat ca în reacțiile descrise anterior (Williams și Silver, 1984).

Figura 332 prezintă sintetic ciclul Hg în natură, evidențiind rolul bacteriilor și posibilitățile de acumulare biologică în pești și crustacee.

Spre deosebire de bacterii, organismele mai evoluate nu au capacitatea de detoxifiere a compușilor Hg. Ceva mai mult, crustaceele pot sintetiza *metil-Hg-tiometil*, care se acumulează în organismul lor și al peștilor. Ele metabolizează metantiolul format în cursul degradării celulelor prin putrefacție, care, reacționînd ca ionul mercuric, în prezența metil-$B_{12}$, determină producerea de metil-Hg-tiometil, după reacțiile :

$$CH_3SH + Hg^{2+} \rightarrow CH_3SHg^+ + H^+$$

$$B_{12}\text{-}CH_3 + CH_3SHg^+ + H_2O \rightarrow CH_3SHgCH_3 + B_{12\text{-}r}$$

Tendința $HgCH_3$ și a altor complexe organomercurice stabile în apă de a intra în rețelele trofice și de a se acumula în organismele vii are un caracter de deosebită gravitate. Limita dintre doza tolerată și cea toxică este foarte mică și complexele metaloorganice o pot depăși cu mare ușurință.

O expresie tipică a acestei situații este ilustrată de maladia *Minamata*, descrisă într-o localitate din Japonia (și semnalată ulterior și în alte regiuni

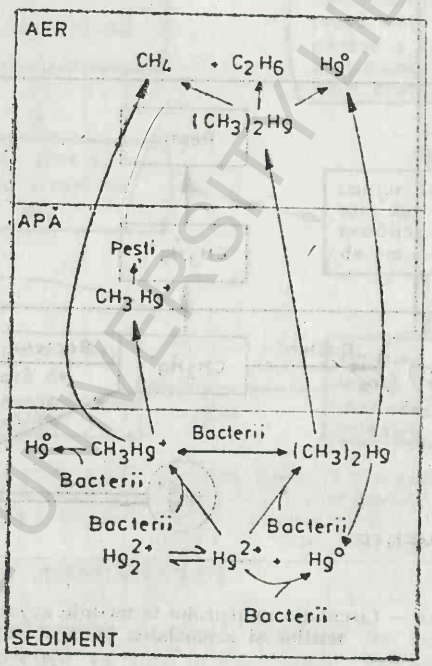



Fig. 332. — Reprezentarea schematică a ciclului biologic al mercurului în natură, evidențiind etapele esențiale efectuate de bacterii (după Wood, 1974).

ale globului), consecutivă consumului de crustacee și pești. Poluarea s-a datorat unui efluent industrial al unei fabrici de mase plastice, care conținea $HgCH_3$ 1%. Boala se manifestă prin tulburări senzoriale și motorii (tremurături, alterarea vorbirii și vederii, tulburări de coordonare etc.). Un număr mare de cazuri mortale s-a datorat efectelor toxice ale $HgCH_3$ asupra sistemului nervos central (inactivarea unor enzime esențiale (adenilat ciclaza), hidratarea și hidroliza plasmalogenilor la compuși toxici, care modifică structura membranelor și favorizează liza neuronilor).

Datorită tendinței generale a $HgCH_3$ de a se acumula în lanțurile trofice acvatice, fenomene similare se pot produce în unele lacuri, în urma poluărilor consecutive tratării semințelor cu fungicide organo-mercurice (fig. 333).

## CICLUL COBALTULUI ÎN NATURĂ

Bacteriile preiau Co anorganic eliberat prin alterarea rocilor și îl folosesc pentru sinteza vitaminei $B_{12}$, indispensabilă organismului uman. În același timp, ele modifică starea de oxidare a Co, care, la rîndul său, modifică reactivitatea acestuia (Wood, 1976). În vitamina $B_{12}$, atomul de Co poate

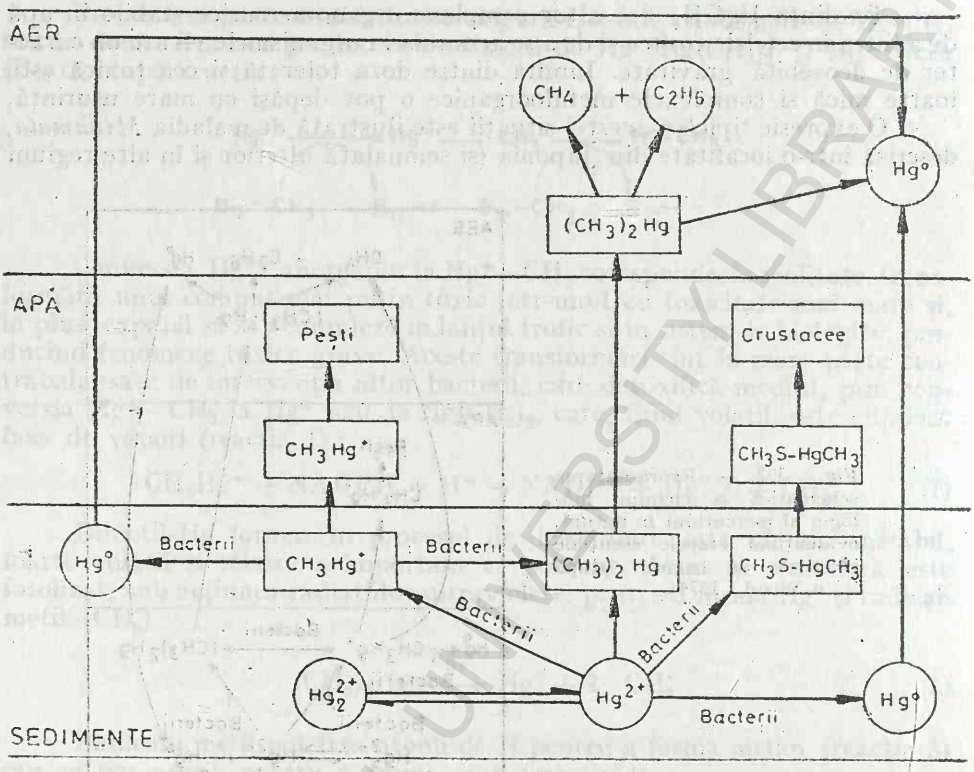



Fig. 333. — Circulația mercurului în mediile acvatice, evidențiind etapele cu participarea bacteriilor și acumularea la pești și crustacee (după Wood, 1976).

avea trei stări distincte de oxidare ($Co^{3+} + e \rightleftharpoons Co^{2+} + e \rightleftharpoons Co^{1+}$). Dintre acestea, $Co^{1+}$ este important datorită capacității de bun reducător, care poate fi alchilat, pentru a produce derivați alchilați ca metil-$B_{12}$ (Wood, 1976).

În organismele animale, vitamina $B_{12}$ este protejată de degradare de către microorganisme în intestin prin legarea de o proteină (factorul intrinsec). Complexul $B_{12}$, factor intrinsec, este transportat pînă în jejun, locul în care are loc absorbția lui în intestin. În sînge, vitamina $B_{12}$ este preluată, după detașarea de factorul intrinsec, de un al doilea grup de proteine — *transcobalaminele* — și vehiculată în circulație. Ea participă la sinteza unor enzime esențiale pentru viața celulei, formînd situsul activ al unor enzime ca, de exemplu, cele care transferă gruparea metil în cursul sintezei metioninei, care participă la sinteza metanului în natură sau intrînd în compoziția unei coenzime ce formează situsul activ al mutazelor, cu rol în sinteza ADN.

Procesele de sinteză a metioninei, metanului și acidului acetic sînt efectuate cu precădere de bacteriile din sedimentele acvatice. Figura 334 prezintă sintetic ciclul Co și relațiile sale cu lanțurile trofice, care îl conduc pe calea vitaminei $B_{12}$ pînă la organismele superioare și la om (Wood, 1976).

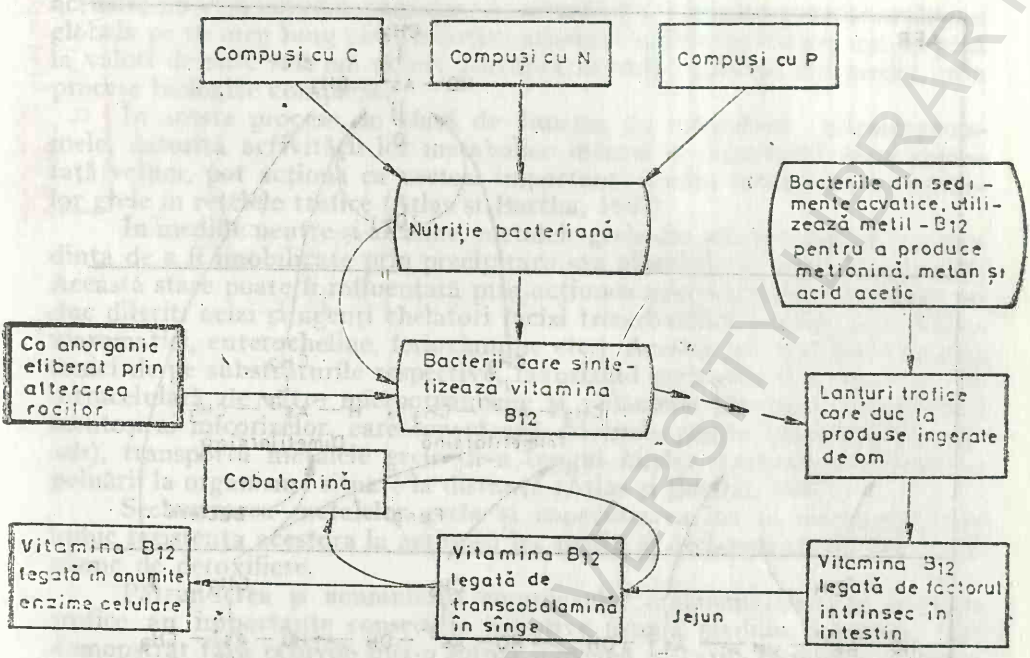



Fig. 334. — Deplasarea cobaltului din roci în organismele superioare. Cobaltul anorganic este încorporat în vitamina $B_{12}$ de către anumite bacterii și transferat de-a lungul lanțului trofic pînă la organismele superioare, inclusiv la om (după Wood, 1976).

## METILAREA ARSENICULUI

Arsenicul este un element nebiogen, frecvent întîlnit în natură. Proprietățile sale toxice sînt cunoscute de mai multe secole. Toxicitatea este determinată de capacitatea arseniatului de a interfera cu fosfatul, substituindu-i-se în formarea compușilor macroergici (Atlas și Bartha, 1987). După Williams și Silver (1984), toxicitatea este în mare măsură dependentă de forma chimică și de starea de oxidare : arsenicalele trivalente ($As^{3+}$) sînt, de regulă, de 100 — 200 de ori mai toxice decît formele pentavalente ($As^{5+}$).

Compușii As sînt reduși și metilați de bacteriile anaerobe și de unii fungi (*Scopulariopsis brevicaulis*) din sedimentele acvatice, cu producere de dimetil-arsine și trimetil-arsine, produși foarte toxici, dar volatili. Aceste arsine sînt ușor oxidate, cu producerea unor compuși mai puțin toxici, de tipul acidului cacodilic. Acest acid este, în același timp, un intermediar în sinteza dimetil-arsinei de la sărurile de As. Aceasta demonstrează existența unui ciclu biologic al As, ca și în cazul Hg (fig. 335).

Un mecanism eficient de detoxifiere a compușilor As este reprezentat de oxidarea bacteriană a arsenitului la arseniat. El este realizat de *Bacillus* sp. și *Alcaligenes faecalis*, care conțin o enzimă specifică, *arsenit oxidaza*.

Ca și în cazul Hg, compușii As pătrunși în lanțurile trofice se acumulează în organismul crustaceelor și al peștilor.

Reacții similare au loc și cu alte elemente ca, de exemplu, seleniul, telurul și sulful.

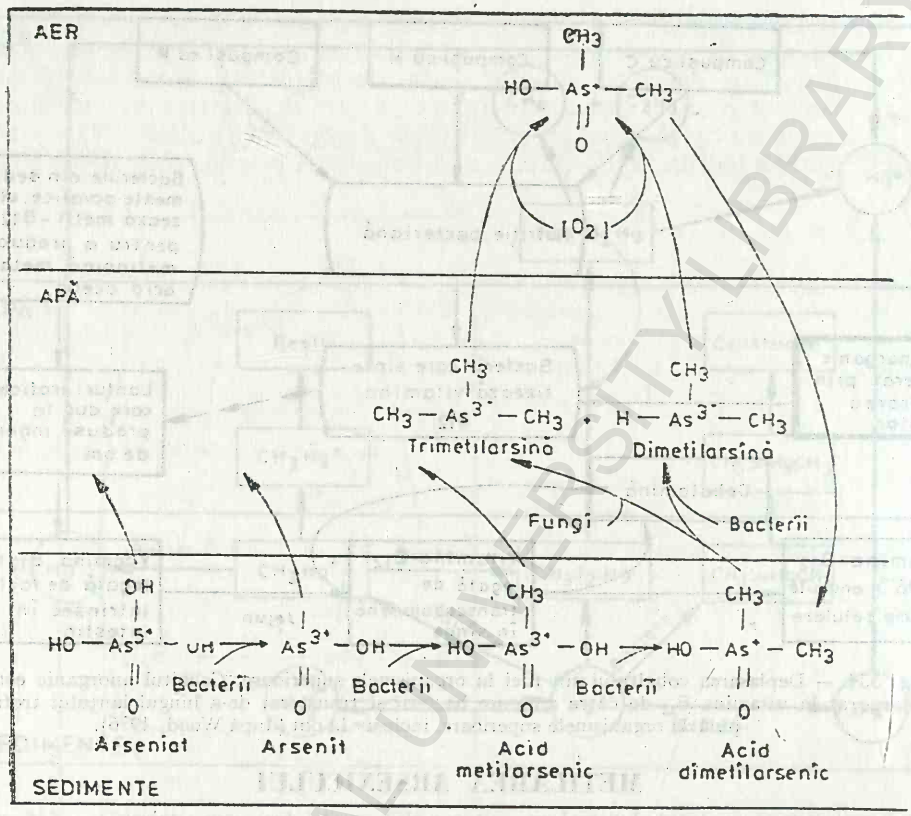



Fig. 335. — Circuitul biologic al arsenicului și compușilor săi în natură, evidențiind principalele etape în care participă bacteriile (după Wood, 1974).

## DETOXIFIEREA COMPUȘILOR CROMULUI

Cromatul ($CrO_4^{2-}$) și bicromatul ($Cr_2O_7^{2-}$), care conțin Cr cu o valență $6^+$, sînt foarte toxici pentru sistemele biologice și au un efect cancerigen pentru om (Roe și colab., 1973). Reducerea $Cr^{6+}$ la $Cr^{3+}$ reprezintă o adaptare biologică importantă, deoarece implică conversia la o formă chimică al cărei efect mutagen este de o mie de ori mai mică (Williams și Silver, 1984).

Tulpinile de *Pseudomonas fluorescens* rezistente la $K_2CrO_4^{2-}$ reduc $Cr^{6+}$ la forme mai puțin toxice cu ajutorul unei enzime legată de membranele celulare — *cromat reductază* (Bopp, Chakrabarty și Ehrlich, 1983).

### Importanța ecologică

În condițiile societăților industrializate, frecvent, o serie de compuși toxici pentru plante și animale poluează mediile naturale. Unii dintre aceștia dispar, fiind degradați la substanțe mai puțin toxice sau chiar inofensive, în timp ce alții sînt persistenți. De aceea „dispariția" lor din mediu prin diluare pînă la concentrații infinitesimale (chiar greu de determinat cu metodele

actuale) nu reprezintă o garanție de securitate. Anumite procese ecologice globale pe termen lung pot concentra anumite substanțe toxice, uneori pînă la valori de sute sau mii de ori deasupra nivelului general din mediu, prin procese biologice complexe.

În aceste procese, în afară de funcția de detoxifiere, microorganismele, datorită activității lor metabolice intense și raportului mare suprafață/volum, pot acționa ca vectori importanți pentru introducerea metalelor grele în rețelele trofice (Atlas și Bartha, 1987).

În mediile neutre și alcaline, metalele grele din sol și sedimente au tendința de a fi imobilizate prin precipitare sau absorbție pe argilele minerale. Această stare poate fi influențată prin acțiunea microorganismelor care produc diferiți acizi și agenți chelatori (acizi tricarboxilici, polioli, acizi hidroxiaromatici, enterocheline, ferioxiamine etc.). Aceștia pot mobiliza compuși toxici de pe substraturile respective, favorizînd preluarea și acumularea lor intracelulară de către microorganisme și rădăcinile plantelor. Fungii filamentoși ai micorizelor, care conectează diferitele plante (vezi cap. *Micorizele*), transportă metalele grele de-a lungul hifelor, favorizînd extinderea poluării la organisme situate la distanță (Atlas și Bartha, 1987).

Sechestrarea metalelor grele și concentrarea lor în microorganisme induc rezistența acestora la acțiunea lor toxică și declanșează diferite mecanisme de detoxifiere.

Pătrunderea și acumularea complexelor organometalice în lanțurile trofice au importante consecințe negative asupra mediilor naturale, fapt demonstrat fără echivoc într-o formă extremă în cazul bazinelor acvatice, care primesc diferiți compuși din apele reziduale. Aceștia sînt frecvent preluați de organismele animale, care îi pot converti la compuși mai toxici și mai difuzibili. Spre exemplu, Hg-$CH_3$ este transformat în intestinul uman în forme mai complexe, ca *metil-Hg-cisteină*, care trece ușor în circulație, este vehiculat, prin legare de grupările sulfhidril ale hemoglobinei, și dispersat ușor pînă la celulele-țintă (neuronii din sistemul nervos central).

Pe lîngă efectele directe asupra organismelor, compușii metalelor grele distrug rețelele trofice din mediile acvatice, agravînd procesele de poluare și de degradare a mediului natural. Populațiile vegetale nu mai sînt consumate de animale, ci mor și cad la fundul bazinului acvatic, unde sînt descompuse anaerob cu producere de $H_2S$ și alte substanțe nocive.

**Aplicații practice.** Descoperirea mecanismelor de detoxifiere biologică a sugerat posibilitatea utilizării lor pentru combaterea poluării cu metale grele.

Hansen și colab. (1985) au demonstrat experimental posibilitatea utilizării unei tulpini de *E. coli* rezistentă la Hg pentru tratarea apelor reziduale foarte poluate cu metale grele. S-a demonstrat că după două săptămîni, concentrația inițială de Hg(70 mg/$l^{-1}$) poate fi îndepărtată cu o eficiență > 98%. Cea mai mare parte din Hg redus, volatil, este eliminat din bioreactor printr-un curent de aer efluent, ceea ce sugerează posibilitatea colectării Hg metalic volatil și reutilizarea lui. Numai o mică parte rămîne în nămolul obținut final.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# ACTIVITATEA GEOLOGICĂ A MICROORGANISMELOR

„Microbiologia mediului pare să fi recăpătat o parte din spiritul explorator al ultimului secol. Legătura strânsă cu cercetarea geologică și geochimică și munca în stil expeditionar pe teren conferă o nouă înfățișare acestui domeniu ...

H. W. JANNASCH

„Microorganismele au un rol predominant în solubilizarea, transportul și depunerea metalelor și minereurilor în mediu. Tehnologiile microbiene reprezintă o alternativă economică pentru industria mineritului actual, pentru tratarea minereurilor și a apelor uzate, într-o perioadă cînd minereurile bogate sînt pe cale de epuizare, costurile energetice cresc, iar efectele adverse pentru mediu ale tehnologiilor convenționale devin tot mai evidente".

S. R. HUTCHINS

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# ACTIVITATEA GEOLOGICĂ A MICROORGANISMELOR

Geomicrobiologia sau litobiologia, după terminologia autorilor anglo-saxoni, este un domeniu al ecologiei microorganismelor, cu caracter interdisciplinar, rezultat din confluența unor concepte aparținînd microbiologiei generale, geologiei, ecologiei și științelor solului.

Perioada din istoria Pămîntului în care activitățile biologice au devenit importante pentru transformarea substanțelor minerale și/ sau organice este nesigură.

Cele mai multe date pledează pentru formarea și diferențierea scoarței Pămîntului cu mult înainte de apariția primelor forme de viață. De aceea, este cert că formarea și degradarea unor minerale s-a realizat, inițial, fără intervenția microorganismelor.

Studiile bazate pe fracționarea izotopilor radioactivi și pe observarea fosilelor pledează pentru existența unor activități geomicrobiene semnificative în Proterozoic, Paleozoic și Mezozoic (Thode și colab., 1962; Cayeux, 1937; Umbreit, 1964).

În prezent, este demonstrat fără ambiguitate că după formarea lor, diferitele tipuri de roci situate la suprafața scoarței sau aproape de ea, sînt expuse forțelor de alterare fizice, chimice și biologice, care le degradează la particule mici sau compuși hidrosolubili.

Acțiunea combinată a acestor forțe asupra constituenților minerali ai rocilor poate determina formarea unor specii de compuși chimici cu solubilitate și stabilitate modificate. Ei pot fi transportați la distanțe mari de roca parentală și precipitați prin mecanisme chimice și biologice în concentrații locale, uneori, foarte mari. Prin compactare pot forma roci sedimentare sau depozite de substanțe minerale (fig. 336).

## TRANSFORMĂRILE MICROBIENE ALE MINERALELOR

Nevoia de a utiliza și transforma cantități foarte mici de substanțe anorganice în cursul metabolismului este o caracteristică a tuturor sistemelor biologice. Microorganismele, spre exemplu, folosesc direct aceste substanțe pentru a sintetiza diferiții constituenți celulari, ca sursă de energie (respectiv ca donatori de electroni sau de H, sau acceptori de electroni sau de H). În aceste situații, singurul caz în care nevoia de substanțe minerale este foarte mare este cel reprezentat de utilizarea lor ca sursă de energie. Astfel, în cazul

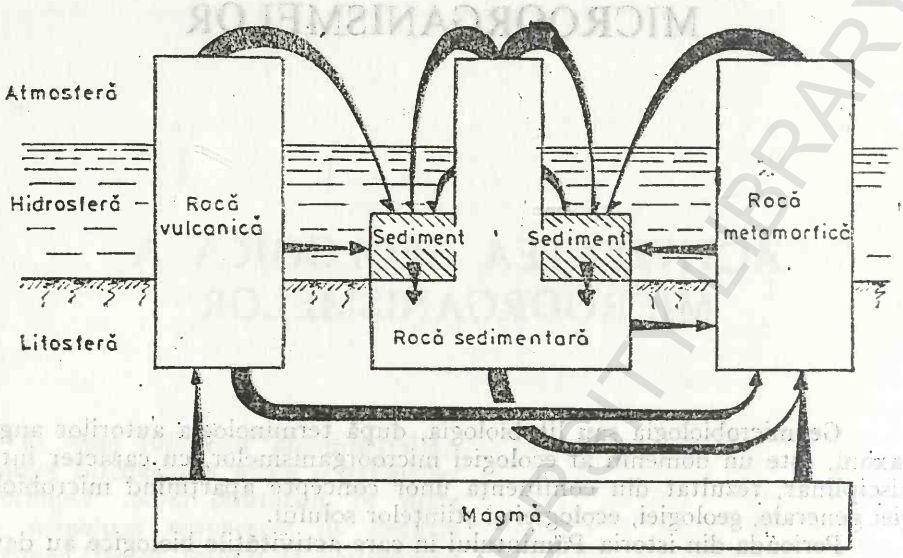



Fig. 336. — Reprezentarea schematică a principalelor evenimente ce intervin în formarea și transformarea principalelor tipuri de roci (după Umbreit, 1964).

bacteriei nitrificatoare *Nitrobacter* sp., care obține energia din oxidarea nitritului la nitrat, sinteza unui gram de masă celulară care conține 0,1 g N necesită oxidarea a 30 g N, sub formă de nitrit. Rezultă, deci, un raport N asimilat/N transformat de 1 : 300. Situația este și mai evidentă în cazul bacteriei *Thiobacillus ferrooxidans*, care obține energie din oxidarea $Fe^{2+}$ la $Fe^{3+}$. Sinteza unui gram de material celular care conține $2 \times 10^{-5}$ g Fe necesită 200 g Fe. Raportul Fe asimilat/Fe transformat este de 1/10 000 000. În celelalte cazuri și, în special, pentru producerea de constituenți celulari, necesitățile cantitative sînt foarte mici (Mulder, 1972). Spre deosebire de acestea, unele microorganisme prezente în mediile terestre sau acvatice pot transforma mari cantități de materie minerală (fig. 337), cu două consecințe evidente :

1) producerea unor agregate minerale relativ insolubile prin transformarea unor substanțe solubile ;

2) solubilizarea unor agregate minerale anterior preexistente, urmată, uneori, de reprecipitarea materiei solubilizate într-o formă diferită.

În natură, primul tip de procese corespunde formării de minerale *, de minereuri** și de roci, iar cel de-al doilea, proceselor de alterare și degradare a unor structuri preexistente. Astfel de modificări se produc și în absența microorganismelor, dar sînt mai lente, au un caracter mai puțin extensiv și evoluează cu o chimie diferită.

---

* *Minerale* = corpi chimici naturali prezenți în structura rocilor sau minereurilor. Sînt alcătuite frecvent dintr-o combinație chimică și, mai rar, din elemente native, formate în cursul proceselor geologice. Cele mai multe sînt anorganice, solide și cristalizate.

** *Minereu* = acumulare de unul sau mai multe minerale, care se pot extrage pe scară industrială în mod rentabil. Conțin unul sau mai multe componente utile (cel mai frecvent metale) sau combinații ale acestora (minereu complex).

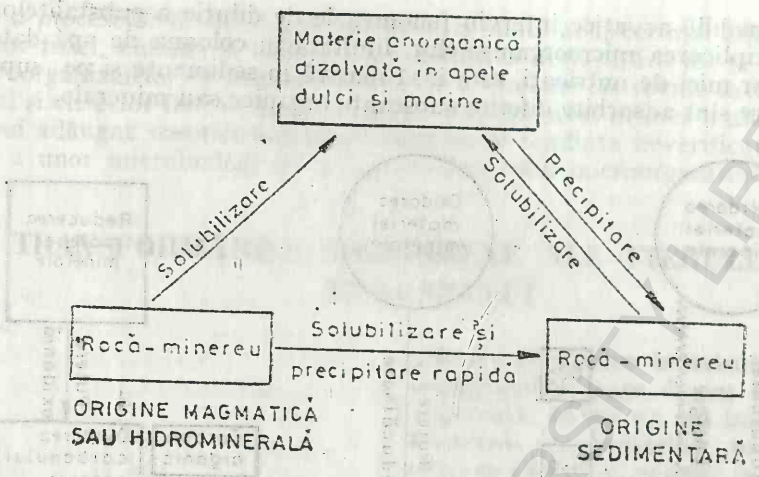



Fig. 337. — Reprezentarea schematică a principalelor tipuri de transformări ale mineralelor ce pot fi induse de microorganisme în natură.

Acțiunea microorganismelor se exercită prin două mecanisme diferite:

1) direct, prin intervenție enzimatică, respectiv prin oxidări și reduceri, hidroliză sau distrugere enzimatică a chelaților;

2) indirect, pe cale neenzimatică, respectiv prin acțiunea unor produși finali de metabolism.

Pe această a doua cale se pot realiza patru tipuri de interacțiuni:

a) *Coroziunea* materiei insolubile, prin efectul acizilor produși în cursul metabolismului. Ea se poate realiza prin acțiunea *acizilor anorganici* (ca, de exemplu, acidul azotic rezultat din nitrificare, acidul sulfuric, produs final al oxidării sulfului, acidul carbonic, produs final al oxidării parțiale sau totale a carbonului organic) sau *acizilor organici*, produși ai oxidării parțiale a C organic.

b) *Precipitarea* carbonaților, a sulfaților și a sulfurilor produse în cursul metabolismului. Procesul poate evolua, uneori, foarte extensiv, avînd ca rezultat formarea de agregate amorfe sau cristaline.

c) *Adsorbția* oxizilor de Fe și Mn pe structurile extracelulare ale bacteriilor, cu formare de incrustații, uneori foarte abundente.

d) *Chelatare*, reacții prin care un compus organic produs pe cale metabolică poate complexa un ion metalic, protejîndu-l de precipitare, oxidare sau reducere.

Procesele de transformare a mineralelor sînt cel mai mult studiate în cazul bacteriilor. Ele se realizează prin mecanisme mai puțin descifrate și sub acțiunea fungilor, a algelor, a protozoarelor, a lichenilor, a unor plante superioare și chiar a unor metazoare (Ehrlich, 1964).

În mediile terestre, care conțin mai puțină apă ca solvent, produșii solubili pot ajunge rapid la concentrații toxice și exceptînd cazurile în care sînt îndepărtați din soluție prin precipitare sau adsorbție, inhibă acțiunea microorganismelor asupra mineralelor.

În mediile acvatice intervin fenomenele de diluție a substanțelor toxice. Multiplicarea microorganismelor, limitată în coloana de apă datorită cantităților mici de nutrienți, este însă masivă în sedimente și pe suprafețele pe care sînt adsorbite diferite substanțe organice sau minerale.

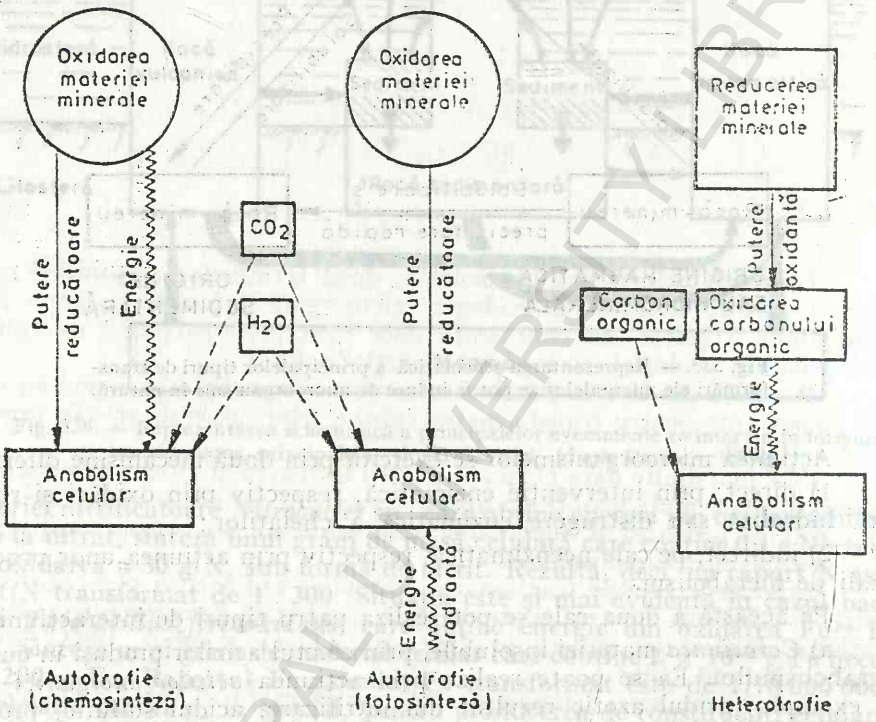



Fig. 338. — Funcțiile majore ale microorganismelor pe plan global în transformarea mineralelor (după Ehrlich, 1965).

Procesele cantitativ majore de transformare a mineralelor sub acțiunea microorganismelor se realizează în special prin reacții de oxido-reducere. Schematizînd foarte mult, ele pot fi reduse la trei tipuri de procese (fig. 338) :

1) Microorganismele autotrofe chemosintetizante oxidează mineralele pentru a obține energia și puterea reducătoare necesare pentru reducerea $CO_2$.

2) Microorganismele fotosintetizante asimilează $CO_2$ cu ajutorul energiei radiante solare. Puterea reducătoare necesară este furnizată prin oxidarea mineralelor.

3) Microorganismele heterotrofe au capacitatea de a oxida anaerob compuși organici cu carbon cu producere de energie utilă ; puterea oxidativă este obținută prin reducerea substanțelor minerale.

Aceste procese pot transforma cantități importante de minerale. Cu toate acestea, preocupările de geomicrobiologie sînt, cu excepția unor domenii restrînse (microbiologia petrolului), foarte limitate. Marea complexi-

tate a proceselor de acest gen, intervenția simultană, cel mai adesea, a factorilor fizici, chimici și biologici, posibilitatea desfășurării lor și în absența microorganismelor, și imposibilitatea de a discerne cît revine factorilor biologici și cît celor fizico-chimici ar putea explica acest interes limitat. Ar mai trebui adăugat scepticismul geochimiștilor și tendința neverificată în practică a unor microbiologi de a supraevalua rolul microorganismelor.

## TRANSFORMĂRILE MICROBIENE ALE FIERULUI ȘI MANGANULUI

**„Marea răspîndire în natură a microorganismelor care depun Fe și Mn sugerează că au un rol important în formarea acumulărilor naturale de oxizi de Fe și Mn, ce apar frecvent sub formă de concrețiuni, particule floculante sau pelicule pe suprafața solului, a sedimentelor sau în mediile acvatice".**

W. C. GHIORSE

Fierul, reprezentînd al patrulea element ca abundență în natură, este prezent, în cea mai mare parte, în forme insolubile, inaccesibile circulației biogeochimice.

Ca și în cazul altor elemente, a fost descris un ciclu biologic în evoluția căruia microorganismele au un rol important. Spre deosebire de cazul altor elemente, acest ciclu poate fi redus la reacții de oxidare ale Fe feros la Fe feric și de reducere a Fe feric la Fe feros.

Reacțiile de oxido-reducere sînt importante atît cu compușii anorganici, cît și cu cei organici ai Fe.

Cele două forme $Fe^{3+}$ și $Fe^{2+}$ au solubilități diferite : $Fe^{3+}$ (feric) precipită în mediul alcalin ca hidroxid feric, în timp ce în condiții anaerobe poate fi redus la forma feroasă mai solubilă.

În condiții naturale, în habitate aerobe, cum este solul bine drenat, cel mai mult Fe este prezent în stare oxidată (ferică). În anaerobioză, în solul inundat se acumulează ca Fe feros.

### Structuri celulare asociate cu depunerea Fe și Mn

Microscopia electronică a microorganismelor provenite din medii naturale sau cultivate *in vitro* pe medii cu Fe și Mn a stabilit existența unor localizări selective în funcție de natura acestora.

**Depunerea intracelulară** este tipică în cazul magnetosomilor. Ea a mai fost semnalată, ca o excepție, la *Bacillus sphaericus*, care acumulează oxizi ai metalelor în interiorul celulelor sporangiale dezorganizate, probabil neviabile, la sfîrșitul sporulării (nu însă și în spor).

După Ghiorse (1984), capacitatea de a acumula și depune Mn ar fi o proprietate relativ răspîndită la mai multe specii de *Bacillus*, care formează oxizi de metal în asociere cu sporularea. Această proprietate ar putea explica

formarea microfosilelor bacteriene — corpi străini bacterieni încrustați cu metale — care ar contribui la depunerea de metale în mediile sedimentare (Beveridge și colab., 1983); de altfel, studiul prin microscopie electronică al microfosilelor bacteriene prezente în rocile din Precambrian sugerează că membranele bacteriilor și polimerii parietali pot contribui semnificativ la depunerea metalelor în sedimente.

**Polimerii extracelulari.** În general, bacteriile care depun Fe și Mn nu formează structuri organizate de tipul capsulei, ci depun polimeri acizi sub formă de strat mucos. De aceea, ele apar inclavate în matricea polimerică impregnată cu metale. Fixarea metalelor ar fi rezultatul unui proces de precipitare nespecifică, ulterior adsorbției fierului coloidal pe grupările acide ale polimerilor. Fenomenul a fost demonstrat pentru o serie de bacterii ca: *Hyphomicrobium, Pedomicrobium, Escherichia* sp., *Micrococcus, Mycobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Corynebacterium* sp. (Mac Rae și Celo, 1975).

După Morgan și Stumm (1965), în bazinele acvatice naturale, orice bacterie care produce polimeri extracelulari acizi avînd suprafața electronegativă poate adsorbi în mod nespecific hidroxizi de Fe (electropozitivi).

Hirsch (1968; 1974) a evidențiat prezența unei particule mari electrodense de *lepidocrocit* (mineral de hidroxid de Fe), asociată cu polimerii extracelulari ai unei bacterii filamentoase care înmugurește. Acumularea particulelor de minerale continuă pînă cînd formează mase floculente care conțin structuri hifale foarte lungi.

*Impregnarea tecilor bacteriene* a fost descrisă la mai multe bacterii:

— *Sphaerotilus natans* prezintă o teacă alcătuită dintr-un complex polizaharid — peptide — lipide, cu grosime variabilă, în funcție de condițiile nutriționale. În plus, pe lîngă teacă, produce un mucus extracelular alcătuit din cantități echimoleculare de glucoză, galactoză și fucoză (Gaudy și Wolfe, 1962). În absența fierului din mediu, tecile sînt netede, cu structură fină, fibrilară, lipsită de membrana externă a bacteriilor. În medii cu Fe, depune hidroxid de Fe printr-un mecanism pasiv, nespecific.

*S. natans* nu depune niciodată oxizi de Mn.

— *Leptothrix* sp., mai puțin studiate, posedă, de asemenea, o teacă de înveliș, precum și o matrice organică formată din polimeri. Natura lor chimică nu a fost încă elucidată. Impregnarea cu metale a fost descrisă atît în cazul tecii, cît și în matricea organică pericelulară pe care o fac electronopacă.

La *L. discophora*, oxidul de Mn este asociat cu membrana externă.

— *Bacteriile pedunculate* au ca prototip *Gallionella* sp., la care celulele reniforme sînt atașate prin regiunea lor concavă de un număr mare de fibrile răsucite în spirală. Fibrilele electrondense sînt impregnate sau acoperite cu hidroxid feric și probabil cu $MnO_2$. Ele mai pot conține cantități mai mici de Si, S, K, Ca, Cu. Regiunea proximală, partea cea mai tînără a fibrilelor, care formează pedicelul este neimpregnată cu metale, ceea ce ar demonstra că celula bacteriană nu participă direct în procesul de depozitare a metalelor.

*Capsula* prezentă la *Siderocapsa geminata*, ca și la *Arthrobacter siderocapsulatus* depozitează, de asemenea, Fe și Mn. Procesul ar fi foarte activ în lacurile meromictice din Karelia.

**Microorganismele care depun oxizii de Fe** sînt prezente aproape în orice regiune a biosferei unde se găsesc depozite de hidroxid de Fe și oxizi de fier și mangan, respectiv în sol, în ape și în condiții extreme în izvoarele termale, din fundul oceanelor și pe rocile din deșerturi.

Această proprietate, considerată inițial ca limitată la bacterii, a fost extinsă și la alte microorganisme ca : alge, fungi și chiar la unele protozoare (Marshall, 1979).

Bacteriile care oxidează $Fe^{2+}$ la $Fe^{3+}$, asigurînd precipitarea ca hidroxid feric, aparțin genurilor : *Sphaerotilus* (*S. natans*), *Leptothrix* (*L. ochracea, L. lopholea, L. pseudoochracea, L. cholodnii*), *Toxothrix* (*T. trichogenes*), *Gallionella, Hyphomicrobium, Pedomicrobium, Clonothrix, Crenothrix, Siderocapsa* (*S. geminata*), *Metallogenium* (*M. personatum, M. symbioticum*), *Seliberia, Naumaniella, Ochrobium* etc.

Microorganismele din genul *Metallogenium* reprezintă un caz aparte, în primul rînd prin contradicțiile privind natura lor. Descrise inițial de Perfil'Ev și Gabe (1961), sînt găsite în solurile bogate în Mn, în care dezvoltarea lor este limitată la stratul superior (~ 50 cm), unde se dezvoltă la maximum toamna tîrziu și la începutul primăverii. Prezența a numeroase celule de *Metallogenium* în sol poate fi considerată ca un indicator de podzolizare (Bolotina, 1975). În mediile acvatice sînt prezente, în special, la interfața dintre aerobioză și anaerobioză, sub forma unui strat subțire, negru, depus pe stratul ocru de oxizi ferici format de *Siderococcus* pe suprafața mîlului. Celulele de *Metallogenium* ajung la o concentrație de $10^6$/gram de mîl umed. *Metallogenium* este, de asemenea, prezent pe suprafața frunzelor, a acelor de conifere și ajunge la un număr maxim în stratul de descompunere activă a frunzelor din litieră, unde oxidează Mn eliberat prin exodermul plantelor.

*Morfologia* prezintă particularități unice, avînd un stadiu inițial cocoid, apoi de coc, din care se diferențiază filamente hifale conice (0,02 — 0,25 μm × 1—10 μm), radiale, care le dă aspectul global de păianjen.

Nu prezintă ultrastructuri evidente și, probabil, nici ADN, ceea ce ar infirma caracterul de forme vii (Ghiorse, 1984).

Conțin oxizi de Mn (70%), apă (11%) și cantități variabile de Fe, S și P.

Unii cercetători (Zavarzin, 1981) susțin că le-au obținut în culturi pe medii speciale, iar alții le-au cultivat numai în asociere cu microfungi de colecție (Bolotina, 1975). Aceasta a generat opinia că transformările și depunerea Mn ar fi rezultatul activității fungilor.

*Metallogenium* sp. oxidează Mn, pe care-l depun treptat, prin încrustarea „coloniilor", fără a-l utiliza ca sursă de energie. Uneori, aceste microcolonii pot crește în masă, determinînd o serie de „înfloriri", cînd ajung la densități de 15 — 340 × $10^3$ microcolonii/ml.

Unii cercetători (Zavarzin, 1981) le consideră ca vii, respectiv ca bacterii, descriind chiar două specii *M. personatum* și *M. symbioticum* (care se dezvoltă numai în asociere cu o specie de microfungi). Ar fi înrudite cu alte specii ca *Siderococcus, Caulococcus, Kusnezovia.*

Alții (Schmidt, 1973; Nealson, 1983; Ghiorse, 1984) contestă caracterul de viu, considerîndu-le ca formate dintr-o materie organică neanimată, cu aspect hifal, produsă prin oxidarea Mn sub acțiunea unor factori oxidanți difuzibili, produși de fungii din mediu. În sprijinul acestei concepții ar pleda

datele lui Mulder și Ress (1972). Ei au obținut structuri cu forme și proprietăți tinctoriale asemănătoare, experimental, în gel de agar, care conținea $Mn^{2+}$, sub acțiunea unui factor difuzibil produs, la oarecare distanță, de către o cultură de *Leptothrix*.

Studiul „microorganismelor" din genul *Metallogenium* este important nu numai pentru rolul lor deosebit în ciclul Mn în natură.

Unii cercetători le consideră cele mai vechi forme de viață, existente încă neschimbate pînă în zilele noastre din Precambrian.

Ele seamănă mult cu microfosilele descrise de Awramik, Barghoorn și Tyler (1977) sub denumirea de *Eoastrion* în formațiunea Gunflint Iron, veche de $10^9$ ani.

### Modul de formare a depozitelor de hidroxid de Fe

Pe baza probelor ultrastructurale, respectiv pe asocierea frecventă a depozitelor de Fe cu unele structuri celulare și cu polimerii extracelulari (polizaharide acide sau complexe proteină — polizaharide), Ghiorse (1984) consideră că depozitarea fierului s-ar putea realiza prin mecanisme atît biologice, cît și abiotic.

**Oxidarea biologică** a $Fe^{2+}$ s-ar realiza în special în condiții de microaerofilie, la pH 6,0, dar și în apele oligotrofe bogat aerate, cu reacție slab alcalină. După depunerea oxizilor de Fe în matricea polimerică, fenomene de cataliză abiotică ar accelera fenomenele de depunere. În condiții naturale, apa subterană care se scurge prin formațiunile de nisip dizolvă sărurile feroase. Cînd ajunge la suprafață, mecanismele oxidative convertesc $Fe^{2+}$ la $Fe^{3+}$, care precipită ca hidroxid feric. Fe depus sub formă de hidroxid feric formează depozite brun-ruginii în izvoare, pe suprafața pietrelor, în apele care curg lent, ca o peliculă iridescentă de $Fe(OH)_3$. De asemenea, plantele acvatice submerse pot fi acoperite de un strat, uneori gros, de hidroxid feric coloidal.

**Autooxidarea**, cea de-a doua modalitate de formare a oxizilor fierului, are loc rapid în condiții de aerobioză și la pH neutru, fără nici o intervenție biologică. În mediile slab oxigenate, autooxidarea are loc cu viteze mult mai mici în special cînd mediul este slab acid (pH 5,0 — 6,0). În aceste condiții, oxidarea biologică a Fe poate deveni mai importantă (Ghiorse, 1984). După ce s-au format prin autooxidare, speciile de hidroxid de Fe rezultate [$Fe(OH)^{2+}$, $Fe(OH)_2^+$] încărcate pozitiv se pot lega de polimerii bacterieni electronegativi.

Rolul comparativ al celor două mecanisme este greu de estimat. Este probabil că în funcție de condițiile de mediu, ele ar putea acționa alternativ sau simultan și sinergic.

### Reducerea $Fe^{3+}$ la $Fe^{2+}$

Datorită oxigenului din atmosferă, cel mai mult Fe din biosferă este prezent în stare oxidată (ferică).

Reducerea lui în mediile naturale este efectuată de bacterii heterotrofe din genurile *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus* și *Pseudomonas*, precum și de unii microfungi (Mulder, 1972).

Fenomenul de reducere a $Fe^{3+}$ la $Fe^{2+}$ a fost descris în hipolimnionul lacurilor stratificate, în care difuzia oxigenului este limitată, și în sedimen-

tele acvatice. În sol, condițiile anoxice determinate de stagnarea apei sau de conținutul mare în argile poate duce la formarea de $Fe^{2+}$, care colorează solul în verzui-cenușiu și îi conferă o consistență lipicioasă.

## TRANSFORMĂRILE MICROBIENE ALE MANGANULUI

Manganul, element esențial pentru microorganisme, plante și animale, este prezent în natură fie în formă redusă ($Mn^{2+}$), fie în formă oxidată ($Mn^{3+}$).

**Oxidarea ionului manganos** ($Mn^{2+}$) la ion manganic ($Mn^{3+}$ sau $Mn^{4+}$) se poate realiza pe trei căi:

1) *Calea pur chimică*, realizabilă în aerobioză, la pH 9,0, cu formare de $MnO_2$ (dioxid de Mn), insolubil în apă.

2) *Oxidarea în prezența hidroxiacizilor* (acid malic, citric, gluconic), demonstrată experimental, este posibilă la valori de pH mai mari de 8,0 și în prezența unor concentrații mari de Mn. Mecanismul ei este controversat și nu exclude intervenția, în anumite faze, a unor microorganisme.

Ambele căi se realizează numai în condiții excepționale în natură, în sol și în apă, al căror pH normal este departe de cel care condiționează oxidarea (Mulder, 1972).

3) *Oxidarea biologică* se realizează prin intermediul unor bacterii (*manganobacterii*) specializate și al unor fungi. Rolul acestora în natură este mult mai important decît cel al microorganismelor care oxidează Fe.

Principalele microorganisme implicate în oxidarea Mn sînt:

**Bacterii:** *Leptothrix* sp. care prezintă precipitate de oxid manganic negru-brun *pe* suprafața sau în structura tecilor, *Gallionella, Hyphomicrobium, Sphaerotilus, Metallogenium*, dar și alte bacterii ca asociația *Corynebacterium/Chromobacterium*. Ulterior, s-a demonstrat că posibilitatea de a utiliza Mn, în loc de Fe, și de a oxida compușii manganoși la compușii manganici este răspîndită în natură la mai multe specii bacteriene din genurile *Aeromonas, Arthrobacter, Bacillus, Caulobacter, Citrobacter, Cytophaga, Flavobacterium, Hyphomicrobiuum, Leptothrix, Metallogenium, Nocardia, Oceanospirillum, Pedomicrobium, Pseudomonas, Proteus, Siderocapsa, Streptomyces* și *Vibrio*. La aceste bacterii, capacitatea de a depune oxizi de Mn a fost demonstrată și în culturi axenice (Ghiorse, 1984). Cu toate acestea, semnificația acestei proprietăți în condiții naturale nu este încă demonstrată fără echivoc.

**Fungi:** *Aureobasidium bolleyi, Caniothrium fuckelii, Phialophora mustea, Plectosphaerella cucumeris, Robillarda sessiles* și o levură *Cryptococcus albidus*.

**Mecanismul oxidării biologice** este incomplet studiat.

După Lynch și Poole (1979), bacteriile și fungii ar acționa după reacția:

$$Mn^{2+} + 1/2\,O_2 + H_2O \rightarrow MnO_2 + 2H^+$$

Oxidarea s-ar produce pe suprafața celulelor bacteriene sau a tecii acestora, sub acțiunea oxidazelor sau a catalazelor, fără beneficiu energetic pentru microorganisme.

Ghiorse (1984) admite, pe lîngă un mecanism enzimatic, participarea unor factori oxidanți ai Mn, localizați în celulele bacteriene, în învelișul sporal sau excretați în mediu. $Mn^{2+}$ liber s-ar lega de polimerii extracelulari electronegativi și ar fi oxidat în matricea acestora. Prezența unor factori oxidanți extracelulari este sugerată de faptul că oxidarea Mn are loc nu numai în afara bacteriilor, dar chiar în afara coloniilor lor. De altfel, s-a demonstrat că *L. discophora* elimină o substanță proteică neenzimatică, implicată în oxidarea Mn, probabil prin formarea unui complex proteină — $Mn^{2+}$. Degradarea ei cu ajutorul pronazei suprimă capacitatea oxidativă. În plus, s-a demonstrat existența unei corelații între cantitatea de Mn care trebuie oxidat și cea de factor proteic oxidant.

**Bazele genetice** ale depozitării Fe — Mn nu sînt cunoscute, fiind foarte puțin studiate.

În cazul unor bacterii acvatice, neidentificate, activitatea de depunere a manganului este asociată cu prezența unei plasmide cu g. m. $24 \times 10^6$ dal. Pierderea ei spontană de către bacteriile-gazdă duce la pierderea capacității de depozitare a Mn. Transmiterea ei la o celulă bacteriană normală îi conferă acesteia capacitatea de legare activă a $^{54}Mn^{2+}$ și de depunere a oxizilor de Mn.

**Reducerea oxidului manganic** se realizează pe cale biologică prin două mecanisme :

1) *Reducerea directă* implică participarea unor microorganisme mai mult sau mai puțin specializate, izolate de Ehrlich (1970) de pe suprafața nodulilor marini care conțin Fe și Mn. În condiții de laborator, ele reduc $MnO_2$ în prezența glucozei și a peptonei. Procesul ar fi realizat de o enzimă adaptativă $MnO_2$-reductaza, funcțională în prezența unei surse de C, N și energie, a $O_2$ și a ionilor $Mn^{4+}$ (Mulder, 1972).

2) *Reducerea indirectă* se realizează prin producerea de compuși reducători ca $H_2S$, care determină conversia rapidă a oxidului manganic la ioni manganoși. Scăderea valorii de pH a mediului (sub pH 5,5) favorizează reducerea, în special în prezența unor compuși organici de tipul hidroxiacizilor. În plus, s-a demonstrat că rădăcinile plantelor pot excreta o serie de substanțe organice reducătoare, care într-un mediu cu pH sub 6,5 produc reducerea și solubilizarea oxidului manganic, asigurînd cantitatea de Mn disponibil pentru o vegetație normală.

## Rolul microorganismelor în formarea nodulilor de mangan

Noduli de Mn sînt concrețiuni minerale, bogate în oxizi de Fe și Mn, prezenți pe fundul tuturor mărilor și oceanelor, cu excepția Mării Mediterane și a Mării Roșii. Au fost descoperite inițial de expediția Challenger (Murray, 1891). Pot conține pînă la 65% mangan ca $MnO_2$. Mărimea lor variază între 1 mm și 20 cm diametru. Creșterea lor este foarte lentă și apreciată de Greenslate (1974) la $\geqslant 1$ mm la 1 milion de ani. În felul acesta, se poate aprecia că un nodul cu diametrul de 4 cm are o vechime de circa 20 de milioane de ani.

Formarea nodulilor a fost considerată ca rezultat al unui proces pur fizico-chimic. Ipoteza originii pur biologice, formulată inițial de Butkewitsch (1928) și apoi de Dorf (1938), este infirmată de Ottow (1983) pe bază de calcule. Este probabil că nodulii de Mn sînt rezultatul acțiunii combinate a oxidărilor chimice și a precipitărilor induse de bacteriile heterotrofe.

În favoarea participării microorganismelor pledează prezența constantă la nivelul nodulilor a bacteriilor care oxidează și a celor care reduc Mn. Ehrlich (1963) a izolat $10^4$ bacterii viabile per g de nodul sfărîmat și consideră că aceste date subestimează situația reală (datorită sterilizării suprafeței nodulilor și a dificultății de separare a bacteriilor de matricea nodulului). Între speciile bacteriene izolate constant citează pe cele din genurile : *Achromobacter, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Vibrio* și a unor coci neidentificați. Greenslate (1974), pe bază ultrastructurală, consideră că microorganismele au un rol esențial în geneza nodulilor de Mn. Examinînd 71 de noduli, evidențiază prezența unor foraminifere bentonice din genul *Saccorhiza*, care leagă micronodulii de Mn de suprafața macronodulilor.

Abundența structurilor la nivelul nodulilor sugerează că formarea și dezvoltarea acestora în adîncul mării ar fi favorizată de activitatea diferitelor comunități de microorganisme la presiuni mari și la temperaturi de ~ 4°C. Ele ar constitui suprastructura solidă pe care s-ar acumula oxizii de Fe și Mn. Formarea nodulilor de Mn ar fi rezultatul unei acțiuni combinate a oxidărilor chimice și a precipitațiilor induse de activitatea microorganismelor heterotrofe. Oxidarea $Mn^{2+}$ necesită adsorbția bacteriilor pe suprafața nodulilor, prezența $O_2$ și a unor cantități mici de substanțe organice. Rezultă $MnO_2$ care este depozitat, determinînd creșterea nodulului. Depunerea $MnO_2$ este rezultatul unui proces enzimatic, care afectează și încorporarea altor elemente ca Fe, Cu, Ni, Co.

Pe baza cunoștințelor referitoare la biologia bacteriilor implicate în circulația Mn, Ehrlich (1972) consideră că acest proces poate evolua după reacțiile :

$$H_2MnO_3 + Mn^{2+} \rightarrow MnMnO_3 + 2H^+$$

$$MnMnO_3 + 2\,H_2O + 1/2O_2 \xrightarrow{\text{bacterii}} (H_2MnO_3)_2$$

În prezența unor cantități mari de substanțe organice, se poate produce o reducere a $MnO_2$ și, prin aceasta, o dizolvare a concrețiunilor de Mn. Și acesta este un proces enzimatic, asociat cu solubilizarea Cu, Co și Ni, nu însă și cu cea a Fe.

### Depunerea metalelor în mediul marin

Microorganismele au fost frecvent implicate în schimbări de fază (solubil → solid) și în transformări redox ale metalelor (Fe, Mn) în diferite medii (sol, izvoare, lacuri, izvoare vulcanice hidrotermale din fundul oceanelor etc.).

Cowen și Silver (1984) demonstrează existența acestor fenomene în mediul pelagic. Ei au izolat depozite de Fe și Mn asociate cu bacteriile în materialul macroparticulat din coloana de apă oceanică.

Bacteriile care depozitează metalele au o capsulă extracelulară formată dintr-o matrice cu structură fibrilară ce „închide" celula în care se depune metalul. Sînt absente la suprafața oceanului și frecvente la adîncimea de 400 și 800 — 1 450 m, unde pot prezenta 30% din totalul bacteriilor

(fig. 339). Sînt frecvent asociate cu agregatele amorfe care floculează („zăpada marină") și, de asemenea, cu peletele fecale. Toate capsulele conțin Fe, iar cele din regiunile mai adînci Mn.

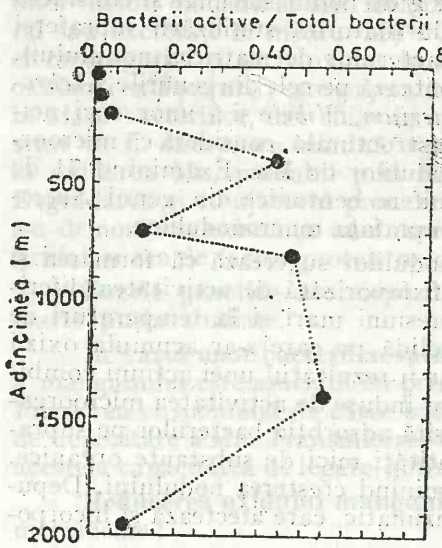



Fig. 339. — Reprezentarea schematică a raportului dintre bacteriile care depun metal, față de numărul total al bacteriilor, în funcție de adîncimea oceanului, la nivelul stației VERTEX II din Pacificul de nord subtropical. Probele au fost recoltate din sediment cu ajutorul sondelor (după Lenart, 1979).

Sursa de Fe depozitat este dublă: 1) fierul solubil (prezent în cantități extrem de mici) și 2) fierul ($Fe^{3+}$) resolubilizat din micromediul agregatelor bacteriene care creează microzone cu Fe solubil. Producerea de acizi organici dizolvați sau activi pe suprafața particulelor comparativ cu apa de mare din jur ar favoriza solubilizarea Fe.

Marea abundență a bacteriilor care depozitează Fe și Mn sugerează un rol important în determinarea fluxului acestuia în apa de mare la adîncimi medii și o influență locală certă în geochimia marină a celor două metale. Aceste date completează observațiile experimentale privind capacitatea bacteriilor de a oxida Fe și Mn în culturi *in vitro* cu apă de mare, ca și pe cele referitoare la prezența lor în sistemele hidrotermale vulcanice din fundul oceanelor sau din nodulii feromanganici.

## Controverse privind contribuția microorganismelor la formarea depozitelor minerale

Deși numeroase observații și date experimentale, ca și prezența constantă a unor microorganisme în asociere cu depozitele minerale sugerează participarea lor în formarea acestora, geochimiștii nu le atribuie un rol prea important. Ei consideră că microorganismele (în special, bacteriile și algele) pot crea condiții de mediu (pH și $E_h$) ce pot duce la oxidarea Fe și Mn, și că pot asigura sau stimula cataliza enzimatică a reacțiilor de oxidare, dar că aceste procese nu au un rol semnificativ în natură. Geochimiștii nu cred într-un mecanism biologic de formare a concrețiunilor de Fe și Mn, pentru că „este greu să admiți rolul bacteriilor în sisteme (Fe și Mn) cărora li se aplică mecanisme pur fiziochimice" (Callender și Bowser, 1976). Este adevărat că nu există probe directe privind participarea bacteriilor, prin experiențe de control în condiții de sterilitate. Ceva mai mult, geochimiștii consideră că aceste experiențe de control nici nu pot fi efectuate în condițiile mediilor sedimentare.

După cum remarcă Ghiorse (1984), microbiologii nu împărtășesc scepticismul geochimiștilor. Microscopia electronică prin transmisie și cea cu scanning au evidențiat frecvent asocierea bacteriilor specializate cu depozitele de Fe și Mn, prezența acestor minerale în interiorul sau în structurile

lor extraparietale (polimeri extracelulari, teci, pedunculi, capsule). De asemenea, este certă prezența concrețiunilor celor două metale în depozitele „feruginoase" din izvoare, sistemele de distribuție a apei, particulele detritice din lacuri și bălți.

## RECUPERAREA METALELOR PRIN ACUMULARE DE CĂTRE MICROORGANISME

**„Realizările naturii însăși, studiile de laborator, aplicațiile deja realizate, precum și diferitele activități ale microorganismelor vor permite recuperarea bogățiilor minerale prea adînc îngropate sau prezente în concentrații foarte mici pentru ca recuperarea lor să fie economic posibilă".**

C. L. BRIERLEY

Capacitatea microorganismelor acvatice de a concentra ionii metalici din soluțiile lor diluate prin adsorbție sau absorbție directă din apă a fost demonstrată de Riley (1965). Ea reflectă o proprietate manifestă cu maximă intensitate la bacterii și anume capacitatea de a fixa și precipita intracelular sau pe suprafața lor metalele din soluție. Ea a fost atribuită dimensiunilor mici, caracteristicilor de suprafață și, probabil, raportului mare suprafață/volum, care permite un contact prelungit îndelungat cu metalele din soluție. Protistele eucariote, mai mari, cu tendința de sedimentare mai rapidă și cu un raport suprafață/volum mai mic absorb, în general, cantități mai mici de metale.

Beveridge și Murray (1980) au propus pentru peretele celular de la *Bacillus subtilis* un mecanism de precipitare în două etape: În prima are loc interacțiunea stoichiometrică a metalului din soluție cu grupările chimice reactive de pe suprafața peptidoglicanului. Ulterior, după complexare, situsurile respective devin „centre de nucleare", la nivelul cărora continuă procesul de depunere a metalului sub formă de precipitate chimice. Precipitatele asociate în mod natural cu suprafața bacteriilor variază de la forma de hidroxid de fier amorf coloidal (avînd originea în $[Fe(H_2O)_5OH]^{2+}$ sau în $[Fe(H_2O)_4OH_2]^{+}$ pînă la forme înalt cristalizate, ca lepidocrocitul. Ele pot fi convertite, în timp, de la stadiul de agregat hidratat la cel de minereu anhidru și cristalizat.

Acest proces are o evoluție extrem de îndelungată și se realizează prin litificare, respectiv prin eliminarea lentă a apei, sub acțiunea căldurii și a compactării. În felul acesta, precipitatele de metale asociate cu bacteriile ar reprezenta primele stadii în formarea minereurilor.

Studiul interacțiunilor dintre bacterii și metale a demonstrat că fenomenele de fixare au loc fie activ, prin intervenția celulelor vii, fie pasiv, independent de activitatea metabolică, respectiv în prezența microorganismelor moarte.

Razzell și Trussell (1963), precum și Hutchins și colab. (1986), admit existența a două modalități majore de bioacumulare:

1) complexarea metalelor avînd sarcini electropozitive cu grupările funcționale electronegative de pe suprafața externă a microorganismelor sau asociate cu polimerii extracelulari produși de acestea, și

2) acumularea metalelor în citoplasma microorganismelor.

Ambele modalități au fost demonstrate experimental atît în variantele lor „active", cît și în cele „pasive" determinate de biomasa bacteriană neanimată, deoarece celulele omorîte adsorb metalele la fel de bine ca și cele vii. În cazul celulelor vii, bioacumularea este dependentă de metabolismul celular și, în consecință, influențată de factorii fizici sau chimici care afectează reacțiile biologice.

**Procesele active de acumulare a metalelor**

Aceste procese sînt asociate cu activitatea celulelor vii și au la bază, în afară de interacțiunile cu suprafața celulelor, o serie de mecanisme încă incomplet elucidate, între care au fost citate reacțiile de oxidoreducere, de complexare cu suprafața celulelor, de schimb de ioni, de precipitare, de înglobare intracelulară etc.

Hutchins, Davidson și Brierley (1986), într-o primă încercare de sistematizare a datelor din literatură, le grupează în trei categorii:

1) **Reducerea metalelor** de către microorganisme — implicînd o diminuare a valenței lor — reprezintă un mecanism deosebit de eficient.

— El este cel mai bine cunoscut în cazul reducerii mercurului, a cărei înglobare în celule ca ion mercuric ($Hg^{2+}$) este efectuată de un sistem de transport activ controlat genetic. După înglobare este redus de reductaza mercurică la $Hg^{\circ}$, care difuzează din celulă, fiind pierdut în faza apoasă prin volatilizare.

— Ionii de Fe feric suferă, de asemenea, un proces de reducere în timp ce acționează ca acceptori de electroni în condiții de microaerofilie sau anaerobioză pentru unele bacterii ca *Pseudomonas* sp., *Micrococcus*, *Rhodopseudomonas* sau *Thiobacillus* (Brock și Gustafson, 1976).

— Reducerea oxizilor de mangan sub acțiunea bacteriilor reprezintă o altă modalitate, realizată sub acțiunea unor produși intermediari de metabolism. Fenomenul este întîlnit sub acțiunea bacteriei *T. thiooxidans*, care, crescînd pe sulf elementar, produce $H_2S$ și sulfit. Aceștia reacționează cu $MnO_2$, după reacțiile (Imai, 1978):

$$4\,MnO_2 + H_2S + 3\,H_2SO_4 \rightarrow 4\,MnSO_4 + 4\,H_2O$$

$$MnO_2 + H_2SO_3 \rightarrow MnSO_4 + H_2O$$

2) **Precipitarea metalelor sub acțiunea sulfurilor produse de bacteriile sulfat-reducătoare.** Procesul are loc sub acțiunea unor bacterii ca *Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Desulfomonas pigra* etc., care produc $H_2S$ ce reacționează cu cationii metalici liberi sau adsorbiți pe care îi precipită sub formă de sulfuri metalice.

Procesul are loc în natură, determinînd imobilizarea metalelor în sedimentele acvatice. El poate fi folosit pentru concentrarea metalelor grele urmată de recuperarea lor secundară, dar și pentru tratarea efluenților minelor sau industriali și recuperarea metalelor grele (Hutchins, Davidson și Brierley, 1986).

3) **Recuperarea argintului** din suspensiile acvatice este un proces foarte eficient, al cărui mecanism nu a fost precizat.

El a fost demonstrat de Charley și Bull (1979) în cazul asociației *Pseudomonas maltophila*, *Staphylococcus aureus* și *Corynebacterium* sp., care acumulează 300 mg Ag per gram de biomasă bacteriană uscată. Acumularea se realizează cu mare viteză (21 mg Ag/g biomasă/oră), asigurînd îndepărtarea completă a argintului, dintr-o soluție de 1 mM Ag ca nitrat de argint.

Fenomenul este realizabil și cu alte asociații bacteriene. Astfel, cuplul *T. ferrooxidans* — *T. thiooxidans* poate acumula sulfura de Ag ($Ag_2S$), respectiv acantitul, pînă la 250 mg Ag per g de biomasă uscată (25% din greutatea celulelor uscate ca Ag) (Pooley, 1982). Procesul are loc în cursul biosolubilizării minereurilor sulfuroase.

## Acumularea intracelulară a metalelor

Descrisă în mai multe cazuri, acumularea intracelulară a metalelor are un mecanism, de asemenea, incomplet elucidat. Fenomenul este neobișnuit prin rapiditatea cu care se produce: *Pseudomonas aeruginosa* acumulează 100 mg uraniu per litru de soluție în mai puțin de 10 secunde (condiție în care uraniul ajunge să reprezinte ~ 50% din greutatea uscată a bacteriilor).

Una din căile posibile ar fi consecința faptului că, în mod normal, microorganismele posedă sisteme de transport dependente de temperatură și de energie necesare pentru preluarea din mediu a ionilor necesari metabolismului. Pe calea acestora, microorganismele obțin ioni ca $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $K^+$, $Na^+$, $SO_4^{2-}$ etc.

Deși aceste mecanisme sînt, de regulă, foarte selective, nu este exclusă posibilitatea unor substituiri. În consecință, anumiți ioni încărcați negativ ca, de exemplu, anionii cromat ($CrO_4^{2-}$), seleniat ($SeO^{2-}$), vanadat ($VO_4^{2-}$), tungstat ($WO_4^{2-}$) și molibdat ($MoO_4^{2-}$) pot folosi sistemul de transport al sulfatului ($SO_4^{2-}$), acumulîndu-se în celule (Brierley, 1982). În plus, unele microorganisme posedă proteine foarte specifice pentru legarea metalelor. Una dintre cele mai cunoscute este *metalotioncina*, care conține numeroși aminoacizi cu sulf. Prin modificarea spațială (replierea) a catenei polipeptidice, acești aminoacizi sînt apropiați, formînd situsuri active de chelatare (de exemplu, situsuri $HS^-$). Intervenția metalotioneinei explică posibilitatea cianobacteriei *Synechococcus* de a fixa ~ 1,28 atomi de Cd per moleculă.

Cazul cel mai cunoscut și mai studiat de depozitare internă a unor metale este cel al bacteriilor de tipul *Aquaspirillum magnetotacticum*, care includ în structura lor magnetosomi sub forma unor octaedre ușor deformate, alcătuite din magnetită ($FeO_4$). S-a evidențiat că magnetosomii sînt acoperiți de o membrană care, cu excepția a două tipuri de proteine, este identică celorlalte membrane celulare. Aceasta sugerează că depozitarea magnetitei în celule este un proces asistat de membrane (Gorby, Beveridge și Blakemore, 1988).

## Procesele pasive de acumulare a metalelor. Biosorbția

Acumularea pasivă a metalelor este consecința sarcinii electronegative nete a suprafeței celulelor bacteriene. De asemenea, polizaharidele complexe excretate de bacterii și depuse pe suprafața lor fie sub forma unor capsule, fie sub forma unor agregate amorfe laxe au un caracter net anionic. În felul acesta, acumularea pasivă a metalelor, descrisă de Brierley (1990) sub denumirea de *biosorbție*, este rezultatul atracției electrostatice dintre cationii metalici prezenți în mediile acvatice și situsurile anionice de pe suprafața bacteriilor. Pe această cale, grupările electronegative ca ionii fosfat ($PO_4^{3-}$), carboxil ($R—COO^-$), hidroxil ($HO^-$) și sulfhidril ($HS^-$) „adsorb" ioni metalici electropozitivi rapid, reversibil, independent de temperatură și de metabolismul energetic.

Procesul este completat de mecanisme ce nu se exclud reciproc, avînd particularitățile reacțiilor de schimb ionic, de complexare a metalului cu grupări chimice de pe membrana externă a bacteriilor Gram-negative, procese de „nucleare", prin care metalul legat amorsează depuneri progresive a unor cantități tot mai mari de metal.

Există mai multe exemple de acumulare pasivă a metalelor.

Polimerul de *Zoogloea ramigera*, care agregă un număr variabil de celule în flocoane cu morfologie dendritică, vizibile macroscopic, este alcătuit din unități de glucoză, galactoză și piruvat.

Sistemul polimer/bacterie poate adsorbi foarte eficient metale, ajungînd la concentrația de 0,30 g metal/biomasă uscată pentru cupru și 0,10 g pentru cadmiu. Metalele pot fi recuperate ușor prin desorbție în mediu acid. Procesul este activ și pentru uraniu, fapt care permite recuperarea metalelor din soluții complexe.

Fungii pot fi utilizați, de asemenea, pentru bioacumularea metalelor.

*Saccharomyces cerevisiae* fixează ionii de uraniu din soluție la nivelul grupărilor electronegative de pe peretele și membrana celulară, depunînd în jurul celulelor un strat de cristale aciculare de uraniu. Ele pot reprezenta 10—15% din greutatea uscată a celulelor.

În mod asemănător, *Rhizopus arrhizus* neviabil poate prelua din mediu peste 180 mg uraniu/g de biomasă greutate uscată. Această cantitate reprezintă peste 18,5% din greutatea celulelor uscate. Capacitatea de fixare este dublă față de cea a rășinilor schimbătoare de ioni.

Biosorbția uraniului s-ar realiza prin acțiunea, probabil, sinergică a mai multor mecanisme:

1) cu participarea unor grupări chimice aparținînd chitinei din peretele celular;

2) prin complexare urmată de acțiunea metalului fixat ca „focar" de nucleare, asigurînd depunerea de noi cantități;

3) prin hidroliză, urmată de precipitarea hidroxidului de uraniu $UO_2(OH)_2$ pe suprafața celulei.

Mecanisme similare stau la baza capacității biomasei de *Penicillium chrysogenum* și a microbiotei din nămolul activat de a adsorbi radium, cu o capacitate de 14 ori mai mare decît cea a adsorbanților convenționali (Hutchins, Davidson și Brierley, 1986).

Algele prezintă, de asemenea, proprietăți importante de legare a metalelor. Capacitatea de a acumula molibden, seleniu, uraniu sau radium a fost demonstrată la *Spyrogyra*, *Rhizoclonium*, *Cladophora*, *Chara*, *Hydrodictyon* etc.

Unii compuși ai uraniului de tipul carbonaților de uranil $[UO_2(CO_3)^{2-}]$ sau $[UO_2(CO_3)_3^{4-}]$, interacționînd cu alga *Chara*, determină depunerea pe suprafața acesteia a unor carbonați cristalini hidratați, care formează un minereu, numit liebigit $[Ca_2UO_2(CO_3)_3 \cdot 10H_2O]$ (Brierley, 1982).

Alga verde *Cyanidium caldarium*, care se dezvoltă în apele acide (pH 0 — 4,0) din mine, poate fi folosită pentru îndepărtarea prin precipitare și depunere pe suprafața celulară a unor metale ca Fe, Cu, Ni, Al, Cr.

Mecanismul de acțiune este corelat cu sinteza de $H_2S$ (cînd crește la întuneric, anaerob, funcționează un sistem de sulfat-reductaze legate de membrane care produc $H_2S$ determinînd precipitarea metalelor) (Lundgren și colab., 1986).

## Aplicații practice și perspective

Descoperirea fenomenelor de bioacumulare a deschis calea unor biotehnologii menite să asigure îndepărtarea metalelor (Cu, Cr, Al, Ni, Fe, U, Pn, Cd) din apele uzate industriale. Procedeul poate fi folosit pentru combaterea poluării, refacerea apelor de suprafață sau freatice contaminate, precum și pentru recuperarea metalelor respective cu consecințe economice importante.

Biosorbanții produși în prezent în unele țări sînt reprezentanți de granule de biomasă microbiană sau de polimeri microbieni, respectiv exopolizaharide sau materiale de perete celular. Ei sînt compactați într-o masă avînd rezistență la influențe din mediul înconjurător, stabilitate termică, dimensiuni, forme și densități adecvate, precum și capacitate de regenerare (Brierley, 1990).

Biosorbanții leagă metalele prin cel puțin trei mecanisme: 1) reacții de schimb ionic; 2) precipitare consecutivă fenomenului de nucleare amorsat de metalul legat inițial; 3 ) complexare.

Ei sînt comparabili rășinilor schimbătoare de ioni, dar au o capacitate de legare a complexelor metalice mult mai mare decît a acestora. După desorbția metalelor legate, prin diferite procedee, biosorbanții pot fi refolosiți în mod repetat, fără a-și pierde o mare parte din capacitatea de legare. La producerea lor poate fi utilizată biomasa microbiană rămasă neutilizată de la alte biotehnologii (producție de antibiotice, fermentații etc.).

Biosorbanții sînt folosiți în special pentru îndepărtarea cationilor metalelor grele din apele uzate, în special Cd, Cu, Pb și Zn. Aceștia sînt îndepărtați mai ușor decît Ca, K și Na. Există posibilitatea utilizării biosorbanților pentru îndepărtarea metalelor și a metaloidelor anionice, recurgînd la o pretratare chimică a soluției apoase pentru a converti ionii la specii cationice, la optimizarea chimică a soluției pentru a intensifica legarea anionilor de biosorbant sau modificarea biosorbantului pentru a lega specific anioni. Pe această cale se poate realiza legarea arseniatului, a cromatului, a molibdatului și a selenatului Brierley, 1990).

În general, se consideră că utilizarea biosorbanților este adecvată pentru apele industriale și de mină cu volum mare de scurgere și concentrație mică de metale (Cd, Mo, Zn etc.).

Se estimează că tehnologiile ingineriei genetice vor asigura în viitor producerea unor proteine sau a altor biopolimeri cu proprietăți de legare superioare a metalelor sau cu specificitate numai pentru anumite metale (Brierley, 1990).

# ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN GENEZA ȘI DIAGENEZA* ROCILOR *IN SITU*

„Intuitiv, vîrsta și caracterul ubicuitar al procariotelor au sugerat că funcția lor în procesele de biomineralizare a avut consecințe globale și a ajutat la modelarea structurii Pămîntului".

T. J. Beveridge

Bacteriile și fungii din sedimentele unor medii naturale pot juca un rol important în formarea rocilor sedimentare și a unor zăcăminte de minerale. Aceste procese au loc cînd constituenții diferitelor roci sînt supuse degradării prin hidroliză sau coroziune chimică sau biochimică. Compușii solubilizați sînt fie precipitați din nou, în orizonturile solului, fie transportați uneori la distanțe mari de roca parentală. În acest ultim caz, produșii rezultați din alterarea mineralelor solubilizați complet sau parțial sau chiar nesolubilizați sînt supuși unui proces îndelungat de transport, ale cărui durată și amploare determină evoluția ulterioară a materialului, pînă la sedimentarea finală în lacuri, fluvii sau mări, unde se pot compacta și suda pentru a forma minerale noi. În cursul acestui transport, procesele de solubilizare și de complexare pot continua (Krumbein, 1972).

După Dévigne (1976), reorganizările cristaline ale elementelor solubilizate sînt fenomene geologice care nu necesită prezența microorganismelor. Participarea acestora este sugerată de faptul că bacteriile și, în măsură mai mică, fungii pot coloniza particule minerale și organice în suspensie, modificîndu-le forma, mărimea și viteza de sedimentare. Este probabil că bacteriile ar favoriza procesele de compactare și sedimentare prin acțiunea polizaharidelor extracelulare și mai ales prin cea a fimbriilor, al căror rol în compactarea solului și a granulațiilor de nisip a fost demonstrat. Hifele fungice ar favoriza agregarea particulelor, legîndu-le, așa cum s-a demonstrat în studiile referitoare la structura solului.

Unele observații mai actuale confirmă rolul proceselor biologice și chimice, care, împreună sau separat, pot acționa în geneza anumitor mineralizări.

Kuznetsov (1963) citează rolul microorganismelor în geneza caolinitului (silicat hidratat de Al) care provine din degradarea cristalelor de feldspat. Intensitatea procesului de caolinizare este cu atît mai intensă cu cît contaminarea bacteriană este mai masivă și cu cît fărîmițarea rocii sub acțiunea factorilor fizici este mai marcată. El a realizat sinteza experimentală a caolinitului, ținînd seamă de aceste condiții favorizante.

---

* *Diageneza* reprezintă ansamblul modificărilor fizice și chimice care se suprapun în timp și în spațiu, și care au drept consecință principală transformarea unor grămezi de particule sedimentate pe un fond oarecare (terestru sau marin), într-o rocă compactă, a cărei natură petrografică depinde de structura constituenților săi (Dévigne, 1976).

În același sens, Chukhrov (1973) a demonstrat rolul proceselor biologice în geneza depozitelor de ferihidrită (hidroxid feric metastabil) ai căror produși de transformare le conferă culoare roșie caracteristică („Red beds"). Aceste depozite se pot forma fie pe cale de cataliză chimică în care caz ferihidrita apare ca agregate dispersate), fie prin acțiunea bacteriilor feruginoase, care acționează asupra ionilor de Fe feros. În acest ultim caz, depunerile de ferihidrită conțin filamente mari, reprezentînd fantomele bacteriilor feruginoase dispărute.

Prin această particularitate, acest proces reprezintă o excepție, în sensul că permite diferențierea mecanismelor chimice de depunere de cele biologice.

## GENEZA BIOLOGICĂ A ROCILOR CARBONATATE

Calciul este unul din constituenții majori ai scoarței Pămîntului, fiind prezent în natură în special sub formă de carbonat de calciu ($CaCO_3$) și bicarbonat de calciu [$Ca(HCO_3)_2$]. Rocile carbonatate sînt formate în special din aragonit, Mg-calcit și calcit. Prin procese diagenetice sau metasomatice, calcarele pot fi transformate în dolomit (Krumbein, 1972).

Sub formă de cation divalent ($Ca^{2+}$) este necesar tuturor sistemelor biologice pentru funcționarea multor enzime. La bacterii are un rol esențial în stabilizarea constituenților peretelui celular. La foraminifere, cianobacteriile și algele endosimbionte contribuie la precipitarea calciului și la formarea exoscheletului. De asemenea, sub formă de precipitate este prezent în cochilia moluștelor bivalve și a gasteropodelor, precum și în structura coralilor. Ariciul de mare din genul *Cidaris*, prezent în regiunile tropicale și subtropicale, formează spini lungi alcătuiți dintr-un singur cristal de calcită, al cărui ax optic coincide cu lungimea acestora (Zajic, 1969). La vertebrate, calciul este depus în oase și în dinți.

Cea mai mare rezervă de calciu din natură este prezentă în oceane, unde există un ciclu chimic și biochimic. Dizolvarea și precipitarea carbonaților în apele marine tropicale și subtropicale sînt procese continue, rezultat al unui echilibru foarte complex, influențat de producția primară (asimilare), de respirație, de producerea de compuși organici, de modificările de pH și ale potențialului de oxidoreducere, de degradarea bacteriană a compușilor organici, de dezvoltarea complexelor organice ale Ca și Mg, și de adsorbția pe suprafața microorganismelor. De aceea, precipitarea carbonaților în apa de mare a făcut obiectul celor mai multe studii de acest gen (Spencer, 1965; Berner, 1971; Krumbein, 1976).

Sintetizînd datele disparate și în unele cazuri contradictorii se pot admite următoarele concluzii:

— În apa de mare, ca și în alte ape naturale mai bogate în calciu, acesta este menținut în soluție sub formă de bicarbonat de calciu [$Ca(HCO_3)_2$], care este foarte solubil în apă, spre deosebire de carbonatul de calciu ($CaCO_3$), puțin solubil.

— Echilibrul dintre cei doi compuși este influențat de concentrația apei în $CO_2$, care este prezent în stare dizolvată sub formă de acid carbonic ($H_2CO_3$). În felul acesta, sistemul în echilibru implică prezența în limite adecvate a $CO_2$, $H_2CO_3$, $HCO_3^-$, $CO_3^{2-}$ și a ionilor de $H^+$ și $(OH)^-$.

Experimental, s-a demonstrat că precipitarea biologică a $CaCO_3$, ca și dizolvarea acestuia la $Ca(HCO_3)_2$ pot fi incidentale, în sensul că pot fi consecințe ale unor procese metabolice care afectează valorile de pH ale mediului. Astfel, scăderea valorii pH favorizează procesele de solubilizare, iar devierea spre alcalin pe cele de precipitare, în reacția:

$$Ca(HCO_3)_2 \rightleftharpoons CaCO_3 + H_2O + CO_2$$

Mai multe procese biologice pot afecta echilibrul dintre $CaCO_3$ și $Ca(HCO_3)_2$ și precipitarea carbonatului de calciu:

1) Procesul reglator major este fotosinteza. Prin activitatea asimilatorie, algele consumă $CO_2$, pe care îl convertesc la C organic, determinînd o creștere a alcalinității, relativ mică, însă suficientă pentru a favoriza conversia $Ca(HCO_3)_2$ la $CaCO_3$. Acesta fiind mai puțin solubil, precipită.

2) Echilibrul poate fi influențat de concentrația $NH_4^+$, $S^{2-}$, $NO_3^-$, $SO_4^{2-}$. Aceasta explică asocierea precipitării calciului cu procese microbiene ca amonificarea, reducerea nitraților, reducerea sulfaților, degradarea sărurilor organice de calciu, precum și cu alte procese care măresc alcalinitatea mediului.

Cele mai multe procese de acest gen nu sînt posibile în oceanul oligotrof în care sistemul este bine echilibrat, dar pot evolua semnificativ în regiunile cu temperaturi ridicate, colonizate de un număr mare de microorganisme, cum sînt cele din oceanul tropical, după reacțiile:

$$- (NH_4)_2CO_3 + CaSO_4 \rightarrow CaCO_3[\downarrow] + (NH_4)_2SO_4$$

în care [↓] indică tendința de precipitare.

$$- CaSO_4 + CO_2 + 4H_2 \rightarrow CaCO_3[\downarrow] + H_2S + 3H_2O$$

$$- Ca(COOCH_3)_2 + 4O_2 \rightarrow CaCO_3[\downarrow] + 3CO_2 + 3H_2O$$

Aceste procese au loc, mai ales, la suprafața sedimentelor prin acțiunea bacteriilor sulfat-reducătoare și denitrificatoare. Ele au avut o mare importanță geologică, au contribuit la formarea de depozite calcare și explică existența rocilor calcaroase nestratificate, groase, formate de-a lungul miilor de ani (Krumbein, 1972).

Microorganismele implicate în procesele de precipitare biologică a $CO_3Ca$ sînt puțin cunoscute. Bacteriile sînt mai puțin active. Speciile descrise ca implicate în mod curent (*Bacterium calcis*, *B. precipitatum*, *B. savanense* etc.) (Zajic, 1969) sînt în prezent contestate. De altfel, nămolurile carbonatate studiate pînă în prezent conțin un număr foarte mare și o mare diversitate de bacterii autotrofe și heterotrofe. Krumbein (1972) atribuie un rol important cianobacteriilor și diferitelor tipuri de alge roșii din genurile: *Gloxaura*, *Laurencia*, *Liagora* și tuturor speciilor de *Corallinaceae*.

Unele date interesante sînt relevate de studiul genezei unor roci sedimentare carbonatate recente. Ele sînt formate din resturi de animale marine și, pe lîngă cianobacterii, din mai multe alge care precipită carbonații identificate ca: *Dasycladaceae*, *Codiaceae*, *Charophytae* și *Rhodophyceae* (Pia, 1934; Krumbein, 1972).

În sfîrșit, Müller și Blaschke (1969), studiind calcarele și nămolurile carbonatate nestructurate din Marea Neagră, atribuie un rol important în geneza acestora resturilor de alge microflagelate din nanoplancton *(Coccolithophoridae)*, cunoscute din alte cercetări ca deosebit de active în Cretaceu.

## ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN GENEZA STROMATOLIȚILOR

Stromatoliții (gr. „Stroma" = strat, așternut; „lithos" = piatră) sînt structuri cu dimensiuni cuprinse între 1 cm și 1 m diametru, formate din lamele organice și calcare, dispuse în mai multe straturi subțiri suprapuse. Descoperite de Walcott (1899), aceste structuri au devenit importante după evidențierea la nivelul lor a unor microfosile asemănătoare eubacteriilor și cianobacteriilor filamentoase actuale, la nivelul stromatoliților proveniți din formațiunea Gunflint Iron (Ontario, Canada).

Bacteriile incluse în stromatoliți, prezente sub forma unor fosile bine conservate, cu structură tridimensională și pereți celulari pietrificați, au fost descrise sub denumirile de *Eoastrion simplex* și *E. bifurcatum* (Barghoorn și Tyler, 1965).

După Doemel și Brock (1974), stromatoliții s-au format în cursul erelor geologice prin precipitarea calcarului în stratul de cianobacterii de pe suprafața apelor. Creșterea lor a fost foarte lentă, deoarece numai o parte minoră din aceste rețele a fost convertită în stromatoliți. După alți cercetători, stromatoliții clasici formați în Precambrian ar fi rezultatul exclusiv al unor bacterii fotolitotrofe, anaerobe, active în prezența sulfurilor și înrudite cu cele ce aparțin în prezent genului *Chloroflexus*.

Descrise inițial drept cianobacterii, aceste bacterii sînt prezente în izvoarele calde alcaline sau neutre din întreaga lume. Biologia lor actuală ar putea explica producerea unei părți din materia organică a stromatoliților din Precambrian. Dacă această ipoteză — care exclude participarea cianobacteriilor — se va dovedi exactă înseamnă că prezența acestor microfosile datînd din Precambrian nu poate fi utilizată ca dată de apariție a cianobacteriilor și respectiv a fotosintezei oxigenice.

Schopf (1977) consideră că geneza stromatoliților din Precambrian s-ar fi realizat în medii hipersaline, după apariția microorganismelor fotosintetizante, dar înaintea apariției nevertebratelor care ar fi putut împiedica procesul de sedimentare.

În formarea lor, un rol esențial l-a avut precipitarea carbonatului de calciu, ca rezultat al activității metabolice a microorganismelor, și capturarea „granulațiilor" sedimentare în stratul gelatinos pericelular al cianobacteriilor. Creșterea acestora ar fi fost accelerată de iluminarea intensă, care a asigurat fotosinteza și dezvoltarea microorganismelor depuse ulterior sub formă de straturi suprapuse.

Natura biologică a stromatoliților este probată și de existența unor regiuni (Sharkbay, Australia), unde sînt încă în curs de formare.

Pentru explicarea structurii laminare, Doemel și Brock (1974) au urmărit evoluția straturilor de microorganisme care formează adevărate pîsle pe suprafața apei din canalele efluente ale izvoarelor termale (55—70°C) din Yellowstone Park. Componentul major este reprezentat de unele fotobacterii

purpurii mobile și verzi filamentoase (care uneori pot fi prezente în exclusivitate), de regulă asociate cu cianobacterii imobile unicelulare (tip *Synechococcus*). Structurile laminare sînt rezultatul migrării bacteriilor fototrofe în raport cu modificările de intensitate ale luminii. În cursul zilei, cînd iluminarea este maximă, ele sînt amestecate în „pîsla" de celule cianobacteriene, în timp ce noaptea migrează spre suprafața apei pentru a se situa deasupra stratului de cianobacterii. Laminările apar, probabil, ca rezultat al migrării bacteriilor fotosintetizante în cursul zilei spre intensități mai mici ale luminii. Răspunsul fototactic este exact opus celui descris pentru cianobacteriile filamentoase din stromatoliții precambrieni, dar rezultatul net este același: formarea unor „pîsle" microbiene calcificate cu structură laminară.

Studiul proceselor actuale de sedimentare este foarte important deoarece microfosilele bacteriene nu sînt structuri capabile să furnizeze informații deosebite. Din simplele amprente ale unor microsfere sau „bacili" se pot deduce puține date semnificative. De aceea, se poate afirma că informațiile cele mai importante au fost obținute nu din examinarea lor, ci, mai ales, indirect, din studiul microfosilelor în curs de formare în regiunile de depunere actuală a stromatoliților. Faptul că stromatoliții formați recent sînt foarte asemănători celor vechi permite concluzia că cel puțin o parte din microfosilele din formațiunea Gunflint Iron au o origine similară.

**Microfosilele bacteriene** *. Deși în mod curent se consideră că, neavînd părți dure ale corpului, bacteriile nu se pot fosiliza, există, totuși, urme ale existenței lor în epocile geologice îndepărtate, constînd din amprente rămase ca și cele ale plantelor superioare în cele mai vechi straturi ale Pămîntului (fig. 340). Cele mai vechi, datînd de ~3,5 miliarde de ani, au fost evidențiate în rocile sedimentare din formațiunea *Figtree* din Africa de sud, sub forme asemănătoare celor ale arhebacteriilor și cianobacteriilor actuale (de menționat că fotosinteza oxigenică a apărut după 1 miliard de ani). Microfosile cocoide și filamentoase, considerate ca eubacterii și cianobacterii, au fost descrise în formațiunea mai recentă *Gunflint Chert* (șisturi silicioase) din re-

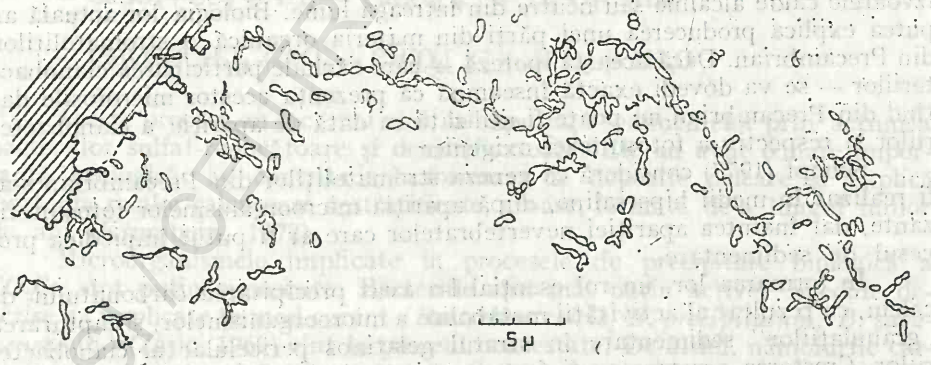



Fig. 340. — Reprezentarea schematică a mai multor celule bacteriene fosilizate dispuse în lanțuri, în grupări neregulate sau izolate, evidențiate prin microoelectronografie în spirite (după Ehrlich, 1965).

* Pentru detalii, vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 443—448.

giunea Lacului Superior (Ontario — Canada). În sfîrșit, în formațiunea *Bitter Spring* au fost evidențiate microfosile de bacterii, cianobacterii, alge verzi și, probabil, fungi.

În conservarea acestor microfosile, un rol esențial revine tendinței naturale a microorganismelor și în special a bacteriilor de a fixa metalele din mediul lichid în care sînt dizolvate și de a le converti în minerale. Prin acest mecanism, structurile moi sînt convertite la minerale tari și dacă condițiile sînt adecvate ele păstrează forma celulelor. Rocile de tip șist silicios (chert) și marnele sînt roci sedimentare cu siliciu care au originea în sedimente inițial împachetate lax, ce conțineau numeroase bacterii.

Microfosilele s-au format prin „încapsularea" bacteriilor în minerale silicioase, grație căreia și-au păstrat forma (Southgate, 1986). Existența resturilor mineralizate ale vechilor bacterii ca microfosile ilustrează capacitatea lor extraordinară de a precipita și mineraliza substanțele organice dizolvate în mediul lichid. Prezența lor demonstrează că aceste procese au început imediat după instalarea perioadei biologice din istoria Pămîntului.

Numărul mare de fosile bacteriene din rocile sedimentare amintite exclude posibilitatea unei contaminări recente, iar, pe de altă parte, o dăinuire timp de lungi perioade geologice este posibilă, mai ales că aceasta n-ar reprezenta un fenomen fără precedent în biologie.

Mult mai neobișnuite și neconfirmate în mod categoric sînt descoperirile lui Lipman și Lieske (din galeriile profunde ale unor mine din Saxonia și Bavaria cu cărbune datînd din Carbonifer) și cele ale lui Dombrowski (1962). Acesta a izolat din cuburi de sare vechi de 180—650 milioane de ani, de la adîncimea de 400 m (regiunea Saskatchewan, Canada), bacterii descrise ca *Bacillus circulans* nefosilizate „mumificate" și chiar bine conservate, deci capabile să-și reia, în anumite condiții, activitățile vitale. Bacteriile izolate nu puteau utiliza glucidele, care intră obișnuit în compoziția mediilor de cultură, fapt ce sugerează că substanțe de acest tip nu existau în epoci geologice atît de îndepărtate. Supraviețuirea lor a fost posibilă datorită stratului gros de rocă salină care le-a acoperit, apărîndu-le de acțiunea radiațiilor și de alți factori inactivanți și s-a realizat nu prin încetinirea activităților vitale, ci printr-o adevărată suspendare a oricărui proces fizic, chimic și biologic (anabioză).

Deși nu au fost infirmate, datele lui Dombrowski sînt discutabile, ținînd seama de capacitatea unor bacterii de a traversa rocile pînă la mari adîncimi, trecînd prin pori, chiar la presiune atmosferică.

În ceea ce privește activitatea bacteriilor din epocile geologice îndepărtate, aceasta nu poate fi apreciată decît în raport cu caracteristicile ei actuale. Activitatea geochimică a bacteriilor în mări și în oceane se desfășoară în microareale, independent de dimensiunile întregii mări. În trecut, această activitate era, probabil, mai intensă la țărmurile mărilor și ale oceanelor și în zonele cu apă mai puțină (golfuri și lagune), unde se acumulează cea mai mare cantitate de substanță organică după moartea florei și a faunei marine. În aceste condiții, în jurul unor acumulări bacteriene de tipul coloniilor s-au putut petrece diferite transformări geochimice, care au făcut ca asemenea colonii să devină centre de sedimentare a compușilor calcaroși și a celor ferici.

Datorită marii lor capacități metabolice, exercitate de-a lungul a milioane de ani, bacteriile, deși au dimensiuni atît de mici, au putut juca un rol

important în istoria planetei, determinînd acumularea unor cantități imense de substanțe minerale ($CaCO_3$, depozite de S și compuși ai fierului etc.), prin care au contribuit la modificarea aspectului Pămîntului.

## ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FORMAREA ZĂCĂMINTELOR DE PETROL

**„Țițeiul, acest fascinant lichid provenit din inimaginabile cimitire de microorganisme ..."**

GEO BOGZA

O parte semnificativă din substanțele organice provenite după moartea organismelor vegetale și animale, precum și a microorganismelor sînt scoase pentru perioade îndelungate de timp din circuitul biologic, prin depozitarea lor sub forma combustibililor fosili, în principal, ca petrol și cărbuni.

Petrolul (L. petra = rocă; oleum = ulei, datorită prezenței în roci sedimentare) este un amestec complex, extrem de heterogen, de hidrocarburi gazoase, lichide și solide la care se adaugă numeroși compuși ai carbonului și hidrogenului cu O, N, S, P.

Compoziția lui este diferită din punct de vedere fizic (în special ca vîscozitate) și chimic de la o exploatare la alta. După ZoBell (1963), proporția medie a principalelor elemente este următoarea: C — 82,2—87,1%; H — 11,7 — 14,7%; S — 0,1 — 5,5%; N 0,1 — 1,5%; O 0,1 — 4,5%, săruri minerale 0,1—1,2%.

În funcție de proveniență, poate să conțină predominant compuși alifatici din seria parafinelor, compuși naftenici din seria benzenică sau compuși din seria polimetilenelor sau a cicloparafinelor. Acestora li se adaugă cantități mici de acizi grași, fenoli, mercaptani, tiofene, asfaltene, sulfone, sulfuri organice, acizi sulfonici, oxizi de sulf, chinoleine etc.

## ORIGINEA ZĂCĂMINTELOR DE PETROL

**„Originea petrolului este una dintre marile enigme ale geologiei"**

C. ZOBELL

Pînă în prezent, nici una dintre teoriile asupra genezei zăcămintelor de petrol nu a putut elucida caracterul reacțiilor chimice din care a rezultat acest amestec extrem de complex, conținînd mii de hidrocarburi. De aceea, teoriile cele mai vechi (teoria originii anorganice, Berthelot, 1866), a originii cosmice (Sokoloff, 1890) etc. au numai o valoare istorică.

În prezent există un acord general asupra faptului că petrolul s-a format, ca și cărbunele, din materia organică supusă unor condiții speciale de mediu și continuă să se formeze, și în prezent, după expresia lui ZoBell „pe aceeași cale veche, deși nimeni nu știe cu siguranță care este aceasta".

Sursa de bază pentru formarea combustibililor fosili este reprezentată pe pămînt de plantele superioare, iar în mediul acvatic (în special în mări și oceane), producătorul primar cel mai important de biomasă—fitoplanctonul—este alcătuit de diatomee, dinoflagelate și unele *Chrysophyceae*, în special coccolitoforidele. Se adaugă resturile organice provenite din lanțul trofic complex caracteristic mediului acvatic, respectiv din zooplancton, animalele marine, microorganisme etc. Luîndu-se ca premisă această origine organică, s-a ajuns să se admită, aproape în mod axiomatic, participarea bacteriilor și a altor microorganisme în procesul de formare a petrolului în epoci geologice îndepărtate, cu atît mai mult cu cît se știe că și în prezent substanțele organice din sedimentele marine sînt expuse degradării microbiene. În plus, microorganismele pot participa în acțiunea complexă de condiționare a mediului marin prin acțiunea lor asupra concentrației $H^+$, a potențialului redox, a tensiunii gazelor, a concentrației carbonaților, a stării în care se găsește sulful etc.

Procesul s-ar realiza, după ZoBell (1963), la presiuni și temperaturi moderate, deoarece țițeiul conține compuși care se distrug la 150—200°C. Ele s-ar realiza în două etape: una inițială, biologică, în care resturile organismelor moarte sînt atacate de bacterii, și o a doua, foarte îndelungată, de transformări fizico-chimice.

## ARGUMENTE ÎN FAVOAREA ORIGINII BIOGENE A PETROLULUI

Cercetările efectuate în ultimele decenii au evidențiat o serie de fapte noi, care pledează pentru participarea bacteriilor și a altor microorganisme la formarea zăcămintelor petrolifere:

1) Petrolul este absent în formațiunile geologice pur anorganice, în care se găsesc doar cantități mici de $CH_4$, precum și în cele apărute anterior evoluției plantelor. Toate zăcămintele studiate sau exploatate sînt recente din punct de vedere geologic. Primele plante au apărut acum 2 500 milioane de ani, iar cele mai vechi zăcăminte nu depășesc vîrsta de 500 milioane de ani (tabelul nr. 67).

Perioada în care s-au format cele mai numeroase zăcăminte de petrol a coincis cu prezența continuă și larg răspîndită a materiei organice bogată în C și H, depozitată în sedimentele marine.

2) În zăcăminte a fost evidențiată frecvent prezența unor microfosile de animale marine, fragmente de lemn pietrificat, mici crustacee, spori fungici, rășine vegetale etc.

3) Prezența în zăcăminte, în probe recoltate de la mari adîncimi (2000—2950 m), a unor bacterii care se reproduc la temperaturi și presiuni mari, într-un număr atît de mare ($12\times10^6$ — $117\times10^6$/g probă de rocă uscată) încît exclude proveniența lor prin contaminare de la exterior.

4) Existența unor bacterii capabile să sintetizeze în condiții artificiale unele hidrocarburi (evident fără complexitatea celor din țiței) și să le încorporeze în citoplasmă sub formă de constituenți celulari.

5) Prezența în special în fracțiunile grele ale petrolului a unor „molecule chimice fosile" provenite din organismele vii a căror sinteză abiotică

*Tabelul nr. 67*

**Vîrsta principalelor formațiuni sedimentare purtătoare de țiței**
(după ZoBell, 1963)

| Era | Perioada | Vîrsta (milioane de ani înainte de prezent) | % cîmpurilor petroliere exploatate |
|---|---|---|---|
| Cenozoic | Pleistocen | 1+0,5 | 50 |
| | Pliocen | 13+1 | |
| | Miocen | 25+1 | |
| | Oligocen | 36+2 | |
| | Eocen | 58+2 | |
| | Paleocen | 65+2 | |
| Mezozoic | Cretaceu | 135+5 | 30 |
| | Jurasic | 180+5 | |
| | Triasic | 230+10 | |
| Paleozoic | Permian | 280+10 | 20 |
| | Pensilvanian | 310+10 | |
| | Mississipian | 345+10 | |
| | Devonian | 405+10 | |
| | Silurian | 425+10 | |
| | Ordovician | 500+10 | |
| | Cambrian | 600 | |
| Precambrian | | 4 500 | |

este greu de realizat. Astfel, au fost evidențiate molecule complexe, importante în geochimia petrolieră pentru recunoașterea tipului de materie organică și în funcție de aceasta calitatea produsului între care:

1) alcani de tipul $C_{15}H_{32}$, considerați ca provenind din alge;
2) alcani de tipul $C_{29}H_{60}$, provenind din plante superioare;
3) acid cholanic de origine animală;
4) izoarborinol (alcool triterpenic), provenind din plante tropicale și
5) hopan (triterpenă pentaciclică), provenind din bacterii și cianobacterii.

Ideea originii biogene a acestor compuși este susținută și de faptul că unele plante, ca și unele țesuturi și excreții animale actuale conțin cantități foarte mici, dintr-o mare varietate de molecule complexe, asemănătoare celor din țiței, între care: 23 de tipuri de hidrocarburi parafinice (de la $CH_4$ la $C_{35}H_{72}$); 34 etilenice (de la $C_2H_4$ la $C_{30}H_{60}$), β-caroten, licopen ($C_{40}H_{60}$), 60 de hidrocarburi cicloparafinice, 16 hidrocarburi aromatice cu nucleu benzenic, naftalenic, antracenic (Tissot, 1977).

## Etapele genezei petrolului

În geneza petrolului, bacteriile acționează în mod cert asupra materiei organice precursoare, pentru a o transforma într-un produs, care seamănă mai mult cu petrolul decît materialul original. Stadiile finale de conversie în

țiței brut sînt fizicochimice. Cantități foarte mici de protopetrol pot apărea după cîteva sute de ani, însă procesul continuă mii și milioane de ani, în cursul căruia, cu vîrsta, compoziția lui se schimbă foarte mult. Se apreciază că, în general, cantitatea de materie organică sustrasă ciclului biogeochimic și conservată în sedimente reprezintă ~ 0,1% din total. Fac excepție unele medii marine ca, de exemplu, Marea Neagră, în care, datorită dispariției $O_2$ de la adîncimea de 200 m și cantității foarte mari de $H_2S$, este depusă o cantitate de 4% din materia organică.

Procesul decurge, după Tissot (1977), în următoarele etape:

**Faza inițială — biologică**, corespunde transformării constituenților majori (glucide, proteine, lipide) din structura organismelor moarte sub acțiunea bacteriilor. Procesul inițiat în cursul sedimentării continuă și în sedimentele marine și lacustre, în nămolul argilos sau calcaros fin.

Inițial, acționează bacteriile facultativ anaerobe, care consumă oxigenul dizolvat în apele din adînc, reduc mult cantitatea de substanță organică și deschid calea intrării în acțiune — temporară — a microorganismelor anaerobe.

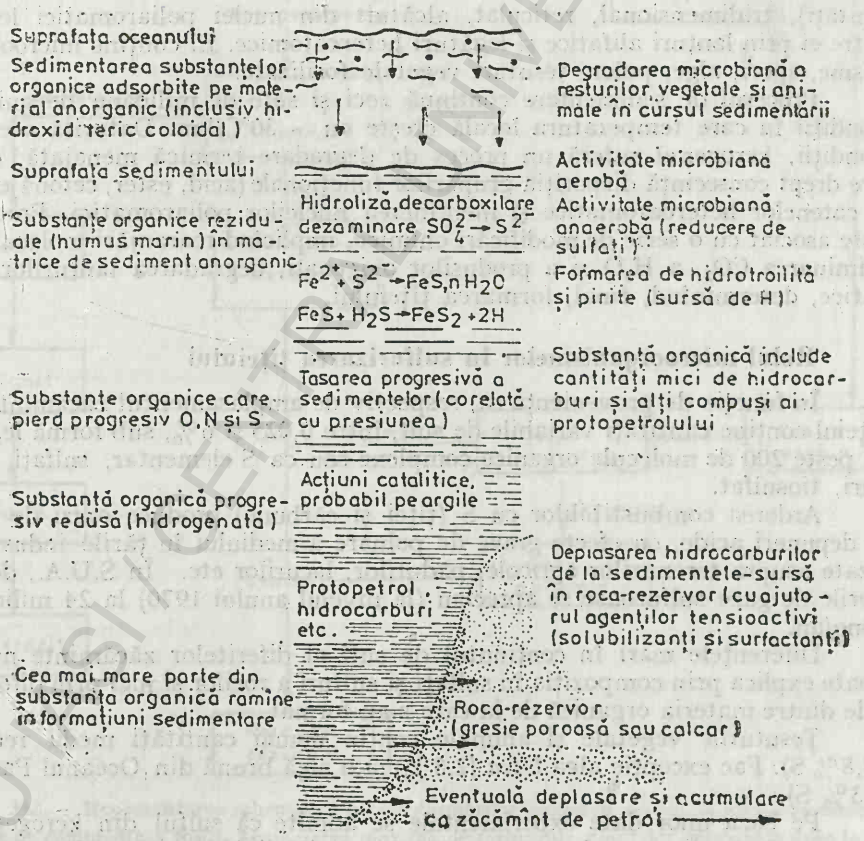



Fig. 341. — Principalele etape ale procesului de transformare a substanțelor organice în petrol (după Smith, 1959, modificat de Davis, 1973).

O parte din constituenţii materiei organice de proveniență biologică este mineralizată la $CO_2$ și $H_2O$, iar alta este folosită pentru sinteza de celule bacteriene, reprezentînd, prin aceasta, redarea lor circuitului biogeochimic. În felul acesta este împiedicată acumularea materiei organice neanimate pe fundul oceanului.

**Faza a doua — fizicochimică.** Cea mai mare parte a materiei organice neanimate trece în această fază, în care lipidele, prin modificări structurale minore, formează moleculele „fosile geochimice", iar aminoacizii și glucidele simple formează, prin policondensare acizii humici și fulvici, asemănători celor descriși în sol (fig. 341). Ei formează humusul marin, produs complex, coloidal, asemănător celui din sol, greu atacabil de microorganisme, aflat într-o stare dispersată, care, datorită continuării procesului de sedimentare, ajunge la adîncimi de zeci și sute de metri. Ca rezultat al continuării procesului de policondensare se realizează transformarea sedimentului organic în *kerogen*, care reprezintă sursa principală de formare a petrolului, a gazelor și a șisturilor bituminoase (fig. 342).

Tissot (1974) caracterizează kerogenul ca un geopolimer (deosebit fundamental de biopolimerii care sînt formați, dintr-un număr limitat de subunități), tridimensional, reticulat, alcătuit din nuclei poliaromatici legați între ei prin lanțuri alifatice și legături heteroatomice. El conține microorganisme, spori, alge, polen, țesuturi vegetale fosilizate.

Procesul de sedimentare continuă zeci și sute de milioane de ani, în condiții în care temperatura locală crește cu ~ 30°C/km. Datorită acestor condiții, kerogenul suferă un proces de degradare termică menajată, care are drept consecință dispariția grupărilor funcționale (acid, ester, cetonă etc.), a catenelor heteroaromatice și menținerea nucleilor poliaromatici. Procesul este asociat cu o serie de modificări chimice, implicînd rearanjări moleculare, eliminarea $CO_2$, a $H_2O$ și a produșilor oxigenați, degradarea lanțurilor alifatice, determinînd, final, formarea țițeiului.

## Rolul microorganismelor în sulfurizarea țițeiului

În funcție de proveniența sa, respectiv de amplasamentul zăcămintelor țițeiul conține cantități variabile de sulf, între 0,025 și 6%, sub formă legată în peste 200 de molecule organice complexe sau ca S elementar, sulfați, sulfuri, tiosulfat.

Arderea combustibililor cu S (țiței și cărbune) produce oxizi de sulf și depuneri acide, cu efecte grave de poluare a mediului în țările industrializate asupra terenurilor agricole, pădurilor, lacurilor etc. În S.U.A., depunerile de gaze sulfuroase se apreciau (la nivelul anului 1970) la 24 milioane tone/an.

Diferențele mari în conținutul de sulf al diferitelor zăcăminte nu se poate explica prin compoziția în sulfați și sulfuri a rocilor și nici prin diferențele dintre materia organică de la care s-au format.

Țesuturile vegetale și animale conțin numai cantități medii reduse (0,8% S). Fac excepție alga *Ulva* (2,8%) și o algă brună din Oceanul Pacific (13% S).

Pe baza unor date experimentale se admite că sulful din kerogen și, în consecință, din petrol este rezultatul activității bacterilor sulfatreducătoare active în faza de sedimentogeneză asupra compușilor cu sulf din mediu, pe care îi introduce în combinații complexe organice. Microorganismele pot

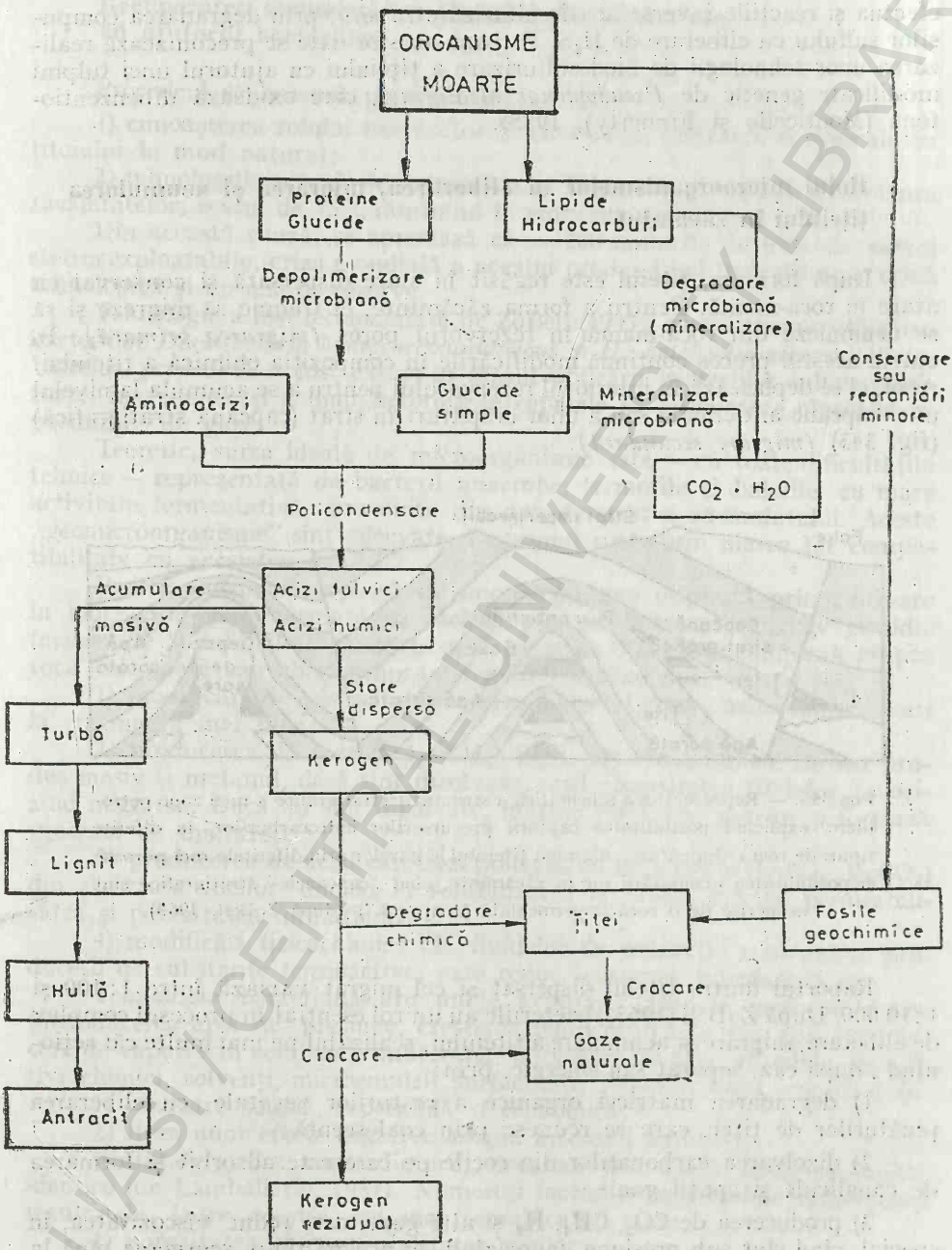



Fig. 342. — Reprezentarea schematică a transformărilor succesive ce duc la formarea zăcămintelor de combustibili fosili. Acumularea maximă de resturi ale plantelor superioare duce la formarea de turbă → lignit → huilă → antracit. Materia organică dispersată de proveniență marină sau terestră va produce petrol sau gaze (după datele lui Tissot, 1977).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

efectua și reacțiile inverse, de desulfurizare *in situ*, prin degradarea compușilor sulfului cu eliberare de $H_2S$. Pe baza acestor date se preconizează realizarea unor tehnologii de biodesulfurizare a țițeiului cu ajutorul unei tulpini modificate genetic de *Pseudomonas alcaligenes*, care oxidează dibenzentiofena (Monticello și Finnerty), 1985).

## Rolul microorganismelor în eliberarea, migrarea și acumularea țițeiului în zăcămînt

După formare, țițeiul este regăsit în stare dispersată și conservat ca atare în roca-mamă. Pentru a forma zăcăminte, el trebuie să migreze și să se acumuleze din roca-mamă în rezervorul poros *(migrarea primară)*. În cursul acestui proces continuă modificările în compoziția chimică a țițeiului. Apoi, el se deplasează în interiorul rezervorului pentru a se acumula la nivelul unei capcane anticlinale sau a unor crăpături în strat (capcană stratigrafică) (fig. 343) *(migrare secundară)*.

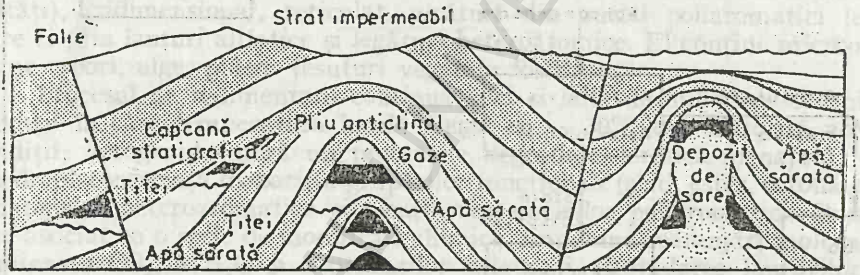



Fig. 343. — Reprezentarea schematică a structurii stratigrafice a unei zone petrolifere, explicînd posibilitatea captării precursorilor hidrocarburilor, în diferite tipuri de roci sedimentare, migrarea țițeiului și gazelor prin diferitele roci poroase și posibilitatea acumulării lor în zăcăminte, cînd „capcanele" stratigrafice sînt acoperite de o rocă impermeabilă („caprock") (după ZoBell, 1965).

Raportul dintre țițeiul dispersat și cel migrat variază între 1:100 și 1:10 000. După ZoBell (1963), bacteriile au un rol esențial în procesul complex de eliberare, migrare și acumulare a țițeiului, realizabil pe mai multe căi acționînd, după caz, separat sau sinergic, prin:

1) degradarea matricei organice a resturilor vegetale, cu eliberarea picăturilor de țiței, care se reunesc prin coalescență;

2) dizolvarea carbonaților din rocile pe care este adsorbit și formarea de canalicule și spații goale;

3) producerea de $CO_2$, $CH_4$, $H_2$ și alte gaze, care reduc vîscozitatea, în special, cînd sînt sub presiune, favorizînd, în același timp, scurgerea pînă la capcane;

4) producerea de acizi grași și substanțe tensioactive, care acționează asupra țițeiului adsorbit sau aflat în emulsie apoasă, stimulînd deplasarea lui spre o capcană structurală sau stratigrafică.

## Recuperarea secundară* a țițeiului din zăcăminte cu ajutorul bacteriilor

Procedeul se bazează pe două argumente:

1) cunoașterea rolului bacteriilor în eliberarea, migrarea și acumularea țițeiului în mod natural;

2) tehnologiile actuale de extracție sînt limitate la 25% din încărcătura zăcămintelor, restul de 75% rămînînd în subteran.

Din această cauză, se apreciază că ~ 200 miliarde de tone de petrol sînt neexploatabile, criza mondială a acestui produs fiind în realitate o criză tehnologică și nu una de rezerve.

Tehnologia a fost recomandată de ZoBell (1947), care a propus utilizarea bacteriilor *Desulfovibrio hydrocarbonoclasticus* și *D. halohydrocarbonoclasticus*. Ulterior, procedeul a fost extins în sensul utilizării bacteriilor sulfatreducătoare, în general, și a unor heterotrofe capabile să fermenteze glucidele cu producere de gaze.

Teoretic, sursa ideală de microorganisme este — cu toate dificultățile tehnice — reprezentată de bacterii anaerobe, termofile și halofile, cu mare activitate fermentativă, provenite din apa de strat a zăcămîntului. Aceste „geomicroorganisme" sînt adecvate, în primul rînd, prin marea lor compatibilitate cu ecosistemul.

Practic, suspensia apoasă de microorganisme obținută prin cultivare în bioreactor este inoculată în zăcămînt cu un substrat nutritiv glucidic (melasa de la fabricile de zahăr), unde exercită o acțiune complexă asupra rocii colectoare sau chiar asupra țițeiului constînd din:

1) modificări de vîscozitate rezultînd din clivarea unor hidrocarburi la fragmente mai mici;

2) producerea de gaze ($CO_2$, $CH_4$, $H_2S$, $H_2$). Bioxidul de carbon produs masiv și metanul, dacă sînt dizolvate, scad vîscozitatea țițeiului, favorizînd migrarea. Dacă nu sînt dizolvate, măresc presiunea gazelor și forțează procesul de migrare;

3) producerea de acizi care reacționează cu mineralele ($CaCO_3$, $MgCO_3$) din structura rocilor, ducînd la solubilizarea acestora, mărind permeabilitatea și porozitatea formațiunii;

4) modificări fizicochimice ale fluidelor de extracție consecutive producerii de substanțe tensioactive, care reduc tensiunea interfacială etc.

Tehnologia bacteriană are unele avantaje față de metodele clasice (introducerea apei sub presiune, creșterea temperaturii *in situ* prin introducere de vapori sau combustie subterană, injectarea de gaze miscibile, de aditivi chimici, solvenți, microemulsii surfactanți, polimeri etc.), constînd în:

1) realizare simplă, repetabilă și economică;

2) lipsa unor efecte negative asupra mediului ambiant.

Rezultatele sînt contradictorii, deoarece nu există două zăcăminte identice (de Lamballerie, 1981). Numeroși factori necontrolabili influențează rezultatele. Între aceștia, cei mai semnificativi sînt:

1) porozitatea și permeabilitatea rocilor;

2) temperatura;

---

* Termen în contrast cu „recuperarea primară", respectiv cu ieșirea spontană a petrolului la suprafață datorită presiunii interne din zăcămînt.

3) gradul de mineralizare și salinitatea apei;
4) toxicitatea (cantitatea și natura compușilor S);
5) valorile de pH;
6) lipsa apei metabolic accesibile;
7) prezența unor roci nepermisive (avînd pori cu o sarcină electrică opusă bacteriilor, pe care le capturează, împiedicîndu-le să-și exercite acțiunea).

Microorganismele sînt implicate într-o gamă largă de probleme asociate cu industria petrolului: degradarea hidrocarburilor, indicatori pentru prospectarea zăcămintelor de petrol și gaze, degradarea aditivilor la lichidele de foraj, blocarea sondelor de injecție, coroziunea conductelor, „rafinarea" petrolului prin utilizarea n-parafinelor la producerea de proteine furajere („Single-cell protein") (Zarnea și Leu, 1967).

## ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FORMAREA TURBEI ȘI A ZĂCĂMINTELOR DE CĂRBUNI

**„Cărbunii, acești frați mai întunecați ai diamantelor, probabil mai folositori decît ele"...**

G. CĂLINESCU

Dinamica descompunerii compușilor carbonului de către microorganisme este extrem de diferită în nișele aerobe și anaerobe.

În mediile aerobe, substanțele organice sintetizate pe cale naturală sînt complet descompuse. Chiar formele chimice complexe, ca lignoceluloza, sînt descompuse în mediile aerobe, prin mineralizare completă sub acțiunea unei populații monospecifice de microorganisme, cum este cazul fungilor putregaiului alb.

În ecosistemele anaerobe, materialele organice cu C, cum sînt ligninele și lignocelulozele, devin recalcitrante la biodegradare și, în consecință, se pot acumula. Sub influența unor comunități complexe de microorganisme, ele pot fi convertite la alte forme recalcitrante (cum este metanul) sau depuse în straturi și expuse unor procese fizicochimice, care determină diageneza la combustibili fosili.

Materialul de bază pentru formarea zăcămintelor de cărbuni pare să fie, în principal, materialele vegetale, alcătuite în, mare majoritate, din lignină și celuloză (Hendrick, 1949). Ele se acumulează în condiții adverse descompunerii lor de către microorganisme.

După Zeikus (1983), formarea cărbunilor ar trece prin stadiul de turbă. Aceasta se formează și în prezent, în diferite regiuni ale lumii, prin procese complexe de degradare și sinteză, avînd la bază acțiunea microorganismelor asupra depozitelor de materiale vegetale.

Diferitele tipuri de turbă au un conținut ridicat de lignină și acizi humici.

Straturile superioare conțin comunități numeroase și variate de bacterii și fungi, al căror număr scade rapid cu adîncimea. Kuznetsov (1963) a găsit în stratul superior al turbei peste 700 milioane de bacterii/g turbă uscată, iar la adîncimea de 25—50 cm numai 25 milioane. În zona aerobă, activi-

tatea microorganismelor este deosebit de intensă. Urmează o zonă intermediară în care procesele biologice pot evolua oxidativ sau reductiv, în funcție de condițiile de mediu ,și o zonă profundă cu o activitate biologică foarte redusă.

Un rol important în geneza turbei au fungii (în special *Fungii Imperfecti)*, care descompun foarte repede țesuturile vegetale. Astfel, țesutul de *Sphagnum* este în mare parte degradat după numai două luni. Ei deschid calea activității degradative a bacteriilor. Prin acțiunea lor asociată, în zonele de suprafață, în prezența materialelor organice ușor asimilabile, a oxigenului și vara la temperaturi ridicate, microorganismele realizează transformarea substanțelor vegetale de-a lungul cîtorva anotimpuri în sensul turbificării. Lipsa de nutrienți organici și conținutul mare în acizi humici împiedică degradarea în continuare a turbei. Prin stratificare se adaugă condiții specifice ca lipsa de oxigen, pH acid și presiuni ridicate.

**Formarea cărbunilor** se realizează printr-un proces similar, trecînd prin stadiul de turbă (fig. 342). Un rol important revine ligninei — cantitativ cel de-al doilea polimer vegetal depus anual în sol (Zeikus, 1983), care nu poate fi degradat în condițiile specifice ale anaerobiozei și, ca atare, se acumulează în cantități mari.

Conversia turbei la lignit, cărbune bituminos și, final, la antracit se realizează, ca și în cazul petrolului, sub acțiunea unor modificări fizico-chimice produse de compactare, temperaturi și presiuni ridicate în cursul erelor geologice. O dovadă a participării microorganismelor în unele stadii ale genezei cărbunilor este furnizată de prezența urmelor de spori de bacterii și fungi microscopici alături de resturile vegetale fosile și chiar în structura unor cărbuni. Renault (1963) a pus în evidență în parenchimul resturilor vegetale din compoziția unor huile datînd din Carboniferul inferior unele bacterii, descrise sub denumirile de *Bacillus vorax, Micrococcus guignardii, M. kymenophagus, Streptothrix anthracis.*

Ca și țițeiul brut, cărbunii proveniți din anumite bazine carbonifere au un conținut ridicat de sulf (pînă la $> 11\%$). Sulful este prezent în forme anorganice, în special ca pirite sau marcasite, cu formula $Fe_2S$, dar cu structuri cristaline diferite și, mai puțin, în forme complexe organice legate covalent în matricea complexă a cărbunelui.

Conținutul ridicat în S ridică probleme grave de poluare a mediului. Prin ardere se formează $SO_2$, care, eliminat în aer, se combină cu umiditatea din atmosferă pentru a forma acid sulfuros ($H_2SO_3$) ce determină un smog foarte iritant (Kellog și colab., 1972; Altschuller și colab., 1983). Pe scară mai mare, contribuie, alături de arderea altor combustibili fosili, la formarea ploilor acide (apa de ploaie, avînd normal pH puțin sub neutralitate, datorită $H_2CO_3$ din atmosferă devine foarte acidă: pH 3,5—4,0) din cauza acidului sulfuros antrenat din atmosferă. Ploile acide afectează sever ecosistemele insuficient echilibrate (tamponate), organismele (în special lezează frunzele plantelor), corodează clădirile și monumentele (în special cele din calcar și marmură. Efectele negative asupra ecosistemelor naturale afectate pot determina eliminarea unor specii de microorganisme, plante și animale și, în general, un declin în productivitatea și biodiversitatea lor.

Ca și în cazul țițeiului, unele microorganisme *(Thiobacillus ferrooxidans, T. novellus, Sulfolobus acidocalcarius* etc.) pot îndepărta sulful din combustibilii fosili înainte de ardere. Starea fizică a cărbunilor sub formă de bulgări

este improprie acțiunii bacteriilor. De aceea, pentru desulfurizare se preconizează sfărîmarea în mediu umed, pînă la o stare mîloasă, acțiunea bacteriilor urmînd să se exercite în cursul transportului printr-un sistem de conducte asemănător celui folosit pentru țiței (Maticello și Finnlay, 1985).

## ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FORMAREA DEPOZITELOR DE SULF

Influența microorganismelor asupra formării și degradării depozitelor de sulf, sulfuri sau sulfați poate fi dedusă pe două căi:

1) prin urmărirea acestor procese în forma în care apar în natură, în momentul de față;

2) prin examinarea formațiunilor geologice vechi și interpretarea rezultatelor cu ajutorul cunoștințelor actuale asupra microorganismelor implicate, pentru a reconstitui diferitele evenimente care au stat la baza formării lor.

**Sulfuretele.** Bavendamm (1924) a descris sub denumirea de *sulfurète* (engl. „sulphuretum"; pl. „sulphuretta") o comunitate biologică unică, rezultată din activitatea microorganismelor implicate în ciclul biologic al sulfului în natură. Ele reprezintă ecosisteme alcătuite din depozite anaerobe bogate în sulf, care se acumulează și în prezent, în care organismele dominante sînt bacteriile sulfatreducătoare și sulfoxidante. Studiul fenomenelor biologice și biochimice la nivelul sulfuretelor demonstrează *a posteriori* rolul microorganismelor în formarea pe cale biogenă a unora din depozitele actuale de sulf.

După cum remarcă Postgate (1979), există și în prezent numeroase microhabitate și chiar unele macrohabitate care furnizează precondițiile necesare dezvoltării sulfuretelor: prezența materiei organice în descompunere, a apelor sau a solurilor intens poluate sau a sulfurilor (ape arteziene, izvoare sulfuroase, proteine în putrefacție). Aceste teritorii sînt ușor populate de bacteriile corespunzătoare și la scurt timp, datorită acțiunii reducătoare a $H_2S$, dobîndesc un grad considerabil de stabilitate ecologică. Final, ele pot deveni un ecosistem care permite dezvoltarea protistelor și chiar a metazoarelor.

Evoluția sulfuretelor are la bază prezența frecventă a sulfaților în soluri și ape, și faptul că, odată amorsată, reducerea lor poate continua perioade îndelungate, dacă există o aprovizionare adecvată cu substanțe organice. În același timp, sulfurile acționează ca agenți chimici reducători, care tind să mențină mediul anoxic necesar pentru activitatea bacteriilor sulfatreducătoare.

Postgate (1979) descrie următorul mod de evoluție, raportat la condițiile unui lac adînc:

Resturile de origine vegetală sau animală în curs de descompunere din sedimentul lacului furnizează materia organică necesară pentru reducerea sulfaților de către bacteriile sulfatreducătoare și formarea sulfurilor.

La nivelele cele mai scăzute la care pătrunde lumina se dezvoltă un strat de bacterii fotosintetizante anaerobe, care oxidează sulfurile.

Deasupra acestei zone, apa este aerobă, iar concentrația sulfurilor dizolvate este relativ mică. Se creează astfel condiții pentru dezvoltarea bacteriilor sulfoxidante aerobe (*Beggiatoa* în apele dulci, *Thiovulum* în apele

marine), *Thiobacillus* sp. etc. Ele oxidează sulful redus din nou la stadiul de sulfat. Prin acest mecanism, ele reciclează sulful, asigurînd și perpetuarea activității sulfuretului. Acest proces este favorizat și de regenerarea substanței organice prin fixarea autotrofă și fotosintetică a $CO_2$. Deoarece bacteriile sulfatreducătoare produc sulfuri, iar cele sulfoxidante fixează $CO_2$, sulfuretul se poate comporta ca un sistem de producție primară anaerobă (deosebit de fotosinteza plantelor, care acționează ca un sistem producător primar aerob). Funcționarea lui este fie limitată de cantitatea de materie organică preformată (pentru producerea de $H_2S$), fie de cea a sulfurilor (pentru fixarea $CO_2$).

Aceste date sugerează că sulfuretele au reprezentat ecosisteme foarte importante în istoria planetei și că depozitele actuale de sulf au fost la origine sulfurete gigante. În prezent, în principal, datorită cantităților reduse de $H_2S$, importanța lor este limitată.

Se apreciază că aproximativ 90% din rezervele mondiale de sulf prezente în Texas și Louisiana sînt de natură biogenă, fiind formate pe locul unor imense sulfurete dezvoltate în cursul evaporării unor mări închise în erele Permian și Jurasic ($2 \times 10$ ani). Depozite de sulf cu origine biologică au mai fost semnalate, de asemenea, în fosta U.R.S.S., Islanda, Noua Zeelandă, Mexic etc.

Un exemplu caracteristic actual este cel al lacului sărat Ainez-Zania din Libia, aprovizionat de un izvor artezian conținînd mult $H_2S$ (100 mg/l), 2% NaCl, saturat cu sulfat de calciu, cu pH 7,4 și cu temperatura de 30°C. Apa, avînd un aspect lăptos datorită sulfului aflat în suspensie, este populată de bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* și conține, în plus, un material roșugelatinos reprezentat de masa zoogleică a bacteriilor sulfoxidante fotosintetizatoare *(Chromatium, Chlorobium)*. Marginile lacului încrustate cu NaCl, sulfat și carbonat de calciu produc 100 tone de sulf/an.

Lacurile sărate din Cirenaica, un ecosistem echilibrat ecologic, asigură o producție de 200 tone de sulf/an. $H_2S$ este produs pe cale biologică din apele saturate cu sulfat de calciu. Bacteriile fotosintetizante *(Chromatium, Chlorobium* etc., precum și *Beggiatoa)* îndeplinesc două funcții: 1) asigură precipitarea sulfului elementar de la $H_2S$ după reacția: $CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{\text{lumină}} (CH_2O)_x + H_2O + 2\,S^\circ$ și 2) furnizează materia organică folosită ca donator de H pentru reducerea bacteriană a sulfatului.

În lacul Sernoe, din fosta U.R.S.S., depunerea de sulf elementar în nămol este de aproximativ 150 kg/zi, prin acțiunea asociată a bacteriilor fotosintetizante purpurii și verzi și a bacteriei *Thiobacillus thioparus.*

În sfîrșit, în lacul Ixpaco, din Guatemala, $H_2S$ de origine vulcanică este oxidat la sulf elementar și $SO_4H_2$. Apa este acidă (pH 2,2). Nămolul conține aproximativ 100 000 celule de *Beggiatoa*/ml și aproximativ 30—60% sulf. Rezerva depășește 100 000 $m^3$.

Formarea depozitelor de sulf nu este limitată la lacuri și bălți. În condițiile anaerobe care prevalează în apele minerale subterane profunde are loc producerea activă de $H_2S$ prin acțiunea bacteriilor. Bacteriile sulfatreducătoare reduc sulfatul de calciu, abundent în aceste medii, ca și sulfații dizolvați în apele din filoane. Bacteriile sînt larg distribuite în apele din stratele provenite din Carbonifer sau Permian și cel mai adesea absente în cele din Devonian, în care concentrația mare de $CaCl_2$ are, împreună cu concentrația mare de săruri minerale (270 g/l), acțiune bacteriostatică.

## Argumente privind originea biogenă a unor depozite de sulf

Sulful prezent natural este format din mai mulți izotopi. Studiile de fracționare ale izotopilor stabili neradioactivi au demonstrat prezența a doi izotopi majori și anume $^{32}S$, considerat ca „normal" (care reprezintă aproximativ 95%) din sulful total, și $^{34}S$ (4%).

Raportul lor variază în diferitele probe de sulf natural analizate. Astfel, sulful din meteoriți are un raport $^{32}S/^{34}S$ relativ constant, considerat de Kaplan și Hulston (1966) ca reprezentativ pentru abundența naturală a izotopilor sulfului în univers. Sulful din sulfații prezenți în apa de mare este îmbogățit în $^{34}S$, iar valoarea acestuia este supusă unor variații locale. Compușii reduși ai sulfului formați prin fenomene geologice ca, de exemplu, prin fenomene vulcanice, au, în general, același raport $^{32}S/^{34}S$ ca și sulful meteoritic. Alte depozite de compuși reduși ai sulfului conțin cantități de $^{32}S$ mai mari decît cele din apa de mare sau din sulful meteoritic.

Descoperirea faptului că bacteriile sulfatreducătoare fracționează izotopii stabili ai sulfului au furnizat o tehnică sensibilă pentru a demonstra natura biogenă a depozitelor de sulf (Jensen, 1962). Cercetările efectuate cu *Desulfovibrio* sp. au arătat că această bacterie reduce preferențial $^{32}SO_4^{2-}$ în comparație cu $^{34}SO_4^{2-}$, ceea ce are drept consecință un raport crescut $^{32}S/^{34}S$ în $H_2S$ produs. Cînd acest $H_2S$ „ușor" este oxidat, sulful elementar ($S^0$) format este de asemenea „ușor". Reacțiile chimice (nebiologice) nu prezintă această preferință pentru izotopul $^{32}S$.

S-a demonstrat că fracționarea celor doi izotopi are loc în cursul reducerii dezasimilatorii a sulfatului, prin ruperea enzimatică a unei legături S—O, în etape intermediare, care implică în special reducerea sulfatului la sulfit (Kaplan, 1966) (fig. 344).

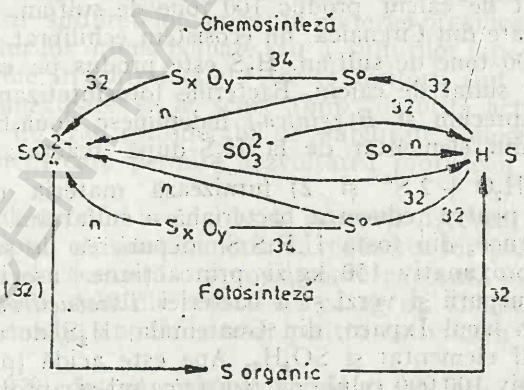



Fig. 344. — Ciclul sulfului, cu indicarea etapelor în care au loc procese de fracționare și în care izotopul este îmbogățit în produs: n = absența fracționării (după Kaplan, 1962).

Acest fenomen este reflectat în compoziția sulfului din zăcămintele sau din sulfurile biogene caracterizate printr-un nivel crescut al raportului $^{32}S/^{34}S$. Depozitele de sulf produse pe cale abiotică nu prezintă această preferință pentru izotopul $^{32}S$. Ca atare, determinarea raportului $^{32}S/^{34}S$ permite diferențierea zăcămintelor biogene de cele formate pe cale abiotică.

Sulful îmbogățit în $^{32}S$ a fost găsit în mai multe zăcăminte formate acum $2-3,5 \times 10^9$ ani. Aceasta demonstrează, după majoritatea cercetătorilor, că procesul de modificare a raportului dintre cei doi izotopi ai S a avut loc în momentul depunerii stratelor din care au fost izolați, deși nu este exclusă posibilitatea producerii lor la distanță urmată de transportul realizat ulterior.

Peck jr. (1979) propune următoarea scală a timpului pentru desfășurarea unor evenimente esențiale ce au urmat formării pămîntului (acum $5 \times 10^9$ ani):

1) instalarea temperaturii fiziologice ($4 \times 10^9$ ani);

2) apariția procesului de reducere dezasimilatorie a sulfaților ($3 \times 10^9$ ani);

3) apariția fotosintezei și a plantelor ($2 \times 10^9$ ani);

4) apariția atmosferei oxigenice și a fosforilării oxidative.

Aceste date sugerează că procesul de reducere dezasimilatorie a sulfatului este foarte vechi, iar bacteriile sulfatreducătoare ar fi adevărate fosile vii.

## ROLUL BACTERIILOR ÎN FORMAREA ZĂCĂMINTELOR DE NITRAȚI

Proprietatea bacteriilor nitrificatoare de a forma, în anumite condiții de mediu, cantități masive de nitrați este cunoscută și valorificată de secole. Ele sînt depuse sub forma unor zăcăminte de $NO_3K$ (salpetru de India) sau de $NaNO_3$ (salpetru de Chile).

Fenomenul este puțin studiat, deși nitrații sub formă de salpetru (l. Sal = sare; petrae = piatră) au numeroase utilizări practice ca îngrășămînt mineral agricol sau în industria explozivelor, a sticlei, metalurgică și alimentară sau la prepararea acidului azotic. Primele date au fost furnizate de Rivero (1821), Girardin (1860), Launey (1910) și Bertrand (1972).

Fenomenul este relativ răspîndit (China, India, Egipt, Ceylon, Ucraina, Spania, sudul Franței, deșertul african etc.). Există regiuni în care nitrații se acumulează în mod natural în cantități atît de mari încît cristalizează la suprafața solului. În unele regiuni din India, recoltarea lor se poate face prin simpla măturare a solului. Există și zăcăminte voluminoase, cum este cel de lîngă Neapole, adînc de $> 30$ m și cu o circumferință de $\sim 400$ m sau mai ales cele din districtele Tarapaca și Atacama (Peru), întinse pe o distanță de peste 200 de km. Exploatate din 1830, depozitele peruane au o producție anuală apreciată la 150 000 t.

Deși cantitatea de N nitric este la prima vedere mică (60 părți N nitric la un milion părți sol), ținînd seama de volumul imens al solului, ea este în realitate destul de însemnată.

Cele mai favorabile condiții de producere naturală a salpetrului se întîlnesc în regiunile cu climat cald și perioade lungi secetoase, ceea ce exclude pierderile prin spălare și în care îndepărtarea apelor uzate sau a altor reziduuri azotate se practică după sisteme primitive.

Nitrații se formează în cantități relativ mici pe pereții pivnițelor, ai peșterilor, ai grajdurilor de animale și chiar ai clădirilor. Ei se extind pe suprafața porțiunilor umede și devin evidenți datorită concentrării determinate de evaporarea apei sub acțiunea căldurii și a soarelui. Producerea lor este rezultatul prezenței inițiale a amoniacului, care este convertit de bacteriile nitrificatoare, inițial la nitriți și final la nitrați.

Fenomenul a fost descris ca tipic în depozitele constituite de-a lungul a mii de ani în marile acumulări de cadavre și dejecții, descrise sub denumirea de *guano* în deșertul Atacama din Chile și în regiunea Pampa Negra din Peru. Sub acțiunea bacteriilor de putrefacție, guano-ul a fost descompus cu formare de amoniac, ulterior convertit la nitrați de bacteriile nitrificatoare.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# BIODEGRADAREA ȘI BIODETERIORAREA MICROBIANĂ

„Trebuie să utilizăm microorganismele nu numai pentru a sintetiza antibiotice, acizi organici sau proteine alimentare, ci și pentru a degrada substanțele organice nedorite"

J. G. DAVIS

„Versatilitatea metabolică a bacteriilor ca grup este determinată de o serie de mecanisme complexe, controlate genetic, care le fac capabile să se confrunte cu modificările din mediu, inclusiv cu introducerea de substanțe noi"

H. A. PAINTER

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# BIODEGRADAREA ȘI BIODETERIORAREA MICROBIANĂ

Conceptul de biodegradare nu are încă un cadru unanim acceptat. În sensul cel mai larg, el se referă la modificarea proprietăților unor materiale, determinată de activitatea biologică a microorganismelor. Acest proces afectează, cel mai adesea, materialele organice, dar nu exclude pe cele anorganice. În acest context, biodegradabilitatea reprezintă capacitatea unui compus de a fi modificat structural de către un agent biologic.

Eggins și Allsopp (1975) au făcut unele precizări menite să asigure o delimitare netă a proceselor de biodegradare de cele de biodeteriorare.

*Biodegradarea* este un proces ce acționează în sens pozitiv, atît în natură, cît și în economia societății umane. Procesele biodegradative pot fi accelerate cu efecte benefice. Pe plan global, ele au o contribuție majoră în circulația elementelor biologice în natură, iar pe plan local împiedică acumularea materialelor reziduale, a diferiților contaminanți ai mediului etc.

*Biodeteriorarea* reprezintă acțiunea prin care microorganismele determină transformarea unui material valoros într-unul rezidual. Este, deci, un proces care acționează în sens negativ, care trebuie, pe cît posibil, evitat sau întîrziat.

Două exemple ilustrează diferențele nete dintre cele două procese. Atacarea hîrtiei care poluează un sol de pădure de către *Chaetomium globosum* sau într-un bioreactor, cu scopul recuperării anumitor constituenți utili, reprezintă un proces de biodegradare. Prin contrast, atacul hîrtiei nefolosite dintr-un depozit de către același microorganism, care o convertește la reziduuri nefolositoare, determinînd pagube economice, reprezintă un proces de biodeteriorare. În mod asemănător, descompunerea țițeiului deversat în apele marine este un proces util, de combatere a poluării prin biodegradare, în timp ce procesele similare dezvoltate în rezervoare sau *in situ* reprezintă o biodeteriorare.

Într-o definiție mai limitativă, aplicabilă compușilor organici, biodegradarea este capacitatea de descompunere aerobă, completă, prin mineralizare pînă la $CO_2$, $H_2O$ și $NH_3$, sau anaerobă, cu produși finali ca $H_2S$, $CH_4$, $CO_2$ și $H_2O$ (Painter, 1974).

Pentru compușii anorganici, biodegradabili, este greu de formulat un cadru adaptabil la toate circumstanțele. El ar corespunde degradării acestora la compuși prezenți în mod normal în ciclul lor natural ca, de exemplu, $NH_3$, $NO_2^-$, $NO_3^-$ și, mai ales, $N_2$.

În general, o anumită substanță organică nu este degradată integral de o singură specie de microorganisme. De obicei, atacul microbian este inițiat de o specie care posedă enzimele extracelulare necesare unei prime scindări a substanței complexe, în componente mai simple și este continuat, pe măsură ce degradarea avansează, de alte specii de microorganisme, care metabolizează mai departe, mult mai rapid, substratele intermediare rezultate din activitatea de degradare inițială. În alte cazuri, microorganismele se adsorb strîns pe substratul încă intact și utilizează numai subunitățile din structura acestuia, care trec spontan în soluție. În sfîrșit, substanțele anorganice prezente ca atare sau rezultate din degradările microbiene pot fi degradate nu prin activități enzimatice, ci sub acțiunea unor produși ai metabolismului microbian.

Procesele de descompunere microbiană implică, în unele cazuri (piele, lemn, hîrtie, textile), distrugerea unităților structurale, ceea ce are ca rezultat pierderea proprietăților funcționale și fizice ale acestor materiale, iar alteori (în special în cazul produselor alimentare) duc la apariția unor produși de catabolism (acizi din glucide, $NH_3$, baze organice, compuși sulfurați din proteine, acizi, aldehide și cetone din lipide), care dau gust și miros neplăcut alimentelor sau sînt toxici.

### Modificări induse de acțiunea microorganismelor

Dezvoltarea și activitatea metabolică a microorganismelor pe diferite substrate expuse biodegradării și/sau biodeteriorării determină: 1) alterări fizice; 2) modificări chimice; 3) impurificări; 4) modificări funcționale.

1) **Modificările fizice** îmbracă o gamă foarte largă, în funcție de natura substratului atacat. Între cele mai caracteristice sînt de menționat: caracterul friabil al hîrtiei atacate, decolorarea și modificarea consistenței (vîscozității) vopselelor, caracterul sfărîmicios al lemnului, gonflarea și pierderea elasticității cauciucului, ruginirea și perforarea conductelor metalice, distrugerea izolatorilor cablurilor electrice.

Frecvent, modificările fizice inițiază sau sînt asociate cu cele chimice. Fenomenul este evident în cazul microfungilor care perforează structurile externe înainte de dezvoltarea hifelor și de declanșarea proceselor de biodegradare.

2) **Modificările chimice** sînt determinate, în general, pe două căi:

a) *Leziunile determinate prin procese de asimilare* corespund situației în care microorganismele utilizează constituenții materialului degradat ca nutrienți: o parte dintre ei sînt convertiți la biomasă microbiană, iar restul sînt degradați pînă la $CO_2$ și apă. Final, materialul originar poate efectiv să dispară. Fenomenul este tipic în cazul celulozei din structura organismelor vegetale: atacată de enzimele extracelulare ale unor bacterii și fungi, celuloza este degradată la celobioză, care, sub acțiunea celobiazei, este convertită la glucoză. Procese similare acționează cu enzime specifice asupra hemicelulozelor și ligninelor, explicînd pierderea rezistenței fizice, fărîmițarea și degradarea masivă a lemnului.

b) *Leziunile produse prin procese de dezasimilare* corespund unor procese de degradare cu eliberarea unor substanțe chimice provenite din materialul supus biodegradării. Și în acest caz există un anumit grad de asimilare, necesar pentru a asigura dezvoltarea microorganismelor și exercitarea efec-

tului de dezasimilare, dar acesta este minor. Ca urmare, densitatea globală a hifelor fungice dezvoltate este foarte mică în comparație cu daunele economice produse prin pierderea rezistenței, prin pătare sau alte acțiuni secundare.

3) **Impurificarea și pătarea („Soiling")** au drept cauză principală prezența și dezvoltarea miceliului fungic, capacitatea acestuia de a acoperi mari suprafețe și de a forma diferite substanțe colorate intens. Fenomenul implică pătarea țesăturilor de bumbac de către pigmenții difuzați din hifele de *Fusarium* sp. sau a celor de nylon de către *Penicillium gantinellum*.

Eggins și Allsopp (1975) citează, de asemenea, cazul pătării produsă de hifele de *Ceratocystis* sau de *Phialospora* pătrunse în lemnul de construcție depozitat necorespunzător, ca și în lemnul recent lucrat. Pierderea în greutate este neînsemnată, însă coloratia albastră produsă de hifele care infectează lemnul determină mari pierderi economice. Biodeteriorarea majoră rezultă din pătare.

4) **Modificările funcționale** sînt întîlnite ca o consecință a fenomenelor de *fuling*. Inițiat de microorganisme, fulingul suprafețelor submerse ale navelor este completat prin depunerea de nevertebrate (*Teredo*, alte moluște, polichete, brahiopode, spongieri, briozoare) și în condițiile de iluminare de micro- și macroalge.

Efectele negative sînt directe (degradarea lemnului, a cauciucului, a vopselelor, a unor mase plastice, a materialelor izolatoare, coroziune etc.) sau indirecte (creșterea în greutate, mărirea rezistenței la deplasare, diminuarea vitezei navelor și consumul mărit de combustibil).

Un rol aparte revine fenomenelor de atacare a izolatorilor cablurilor electrice. Deși concentrația nutrienților este redusă, răspîndirea largă a miceliului, ca și capacitatea de a perfora diferitele structuri izolatoare determină distrugerea acestora, cu alterări de conductibilitate și riscuri de scurt circuitare.

## Factorii care favorizează procesele de biodegradare

Urmărirea evoluției proceselor de biodegradare și biodeteriorare a vidențiat existența unor factori care condiționează sau favorizează evoluția acestor procese:

*Prezența substanțelor asimilabile* sub forma unor surse adecvate de C, N, S, P, Ca, Mg și a unor factori de creștere reprezintă o condiție esențială pentru colonizarea substratului respectiv și a inițierii proceselor de degradare.

*Starea fizică.* Substanțele dizolvate sînt mai ușor atacate decît cele aflate în suspensie, iar acestea, mai ușor decît cele solide (lemn, rocă etc.). În atacarea materialelor solide, microfungii au un avantaj ecologic major, decurgînd din capacitatea de a pătrunde în substrat, exploatînd substratele respective prin capacitatea de a transloca nutrienții de-a lungul hifelor.

*Structura chimică.* Relația dintre structura moleculară și biodegradare este foarte importantă (fig. 345). Astfel, alcoolii, aldehidele, aminoacizii, amidele și acizii organici, în general, sînt mai ușor atacați decît alcanii,

olefinele, cetonele, acizii dicarboxilici. Moleculele complexe, insolubile, cu structură înalt ramificată, cele cu grupări heterociclice și, mai ales, diferiții compuși de sinteză chimică sînt deosebit de rezistenți, iar unii (unele mase plastice) chiar recalcitrante la biodegradare.

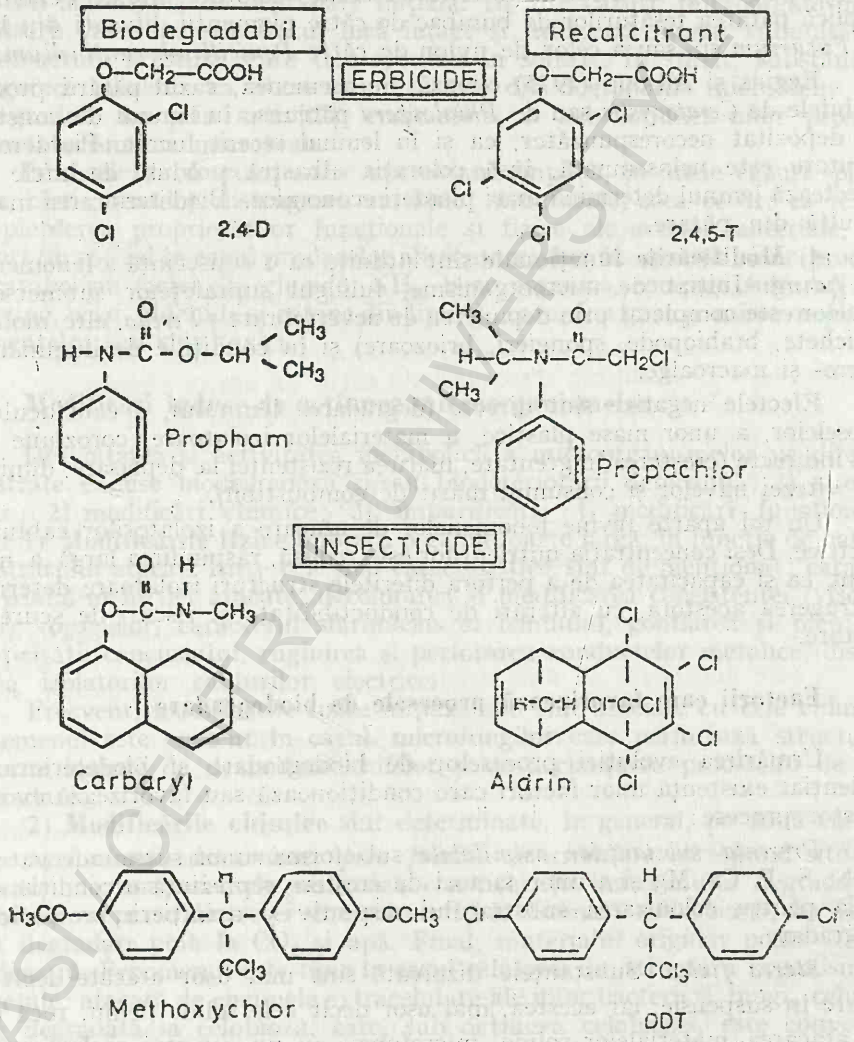



Fig. 345. — Structura moleculară a unor pesticide biodegradabile și recalcitrante, grupate cîte două, pe bază de similaritate structurală globală, cu scopul de a evidenția particularitățile moleculare care fac compușii din coloana din dreapta rezistenți la degradare. Termenii de „biodegradabil" și „recalcitrant" sînt folosiți în sens relativ. Ei nu implică nici biodegradarea rapidă și nici rezistența indefinită (după Atlas și Bartha, 1987).

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

*Umiditatea* reprezintă un factor cu importanță majoră, deoarece, așa cum s-a demonstrat în cazul fungilor, practic, toate microorganismele au nevoie de o peliculă de apă în jurul celulelor pentru a crește și a competiționa cu alte microorganisme. Relația microfungilor cu umiditatea este considerată ca decisivă în determinarea capacității lor de a exploata substratul expus acțiunii lor.

Eggins și Allsopp (1975) citează cazul fungilor aparținînd speciei *Serpula (Merulius) lacrymans*, care atacă lemnul uscat din clădiri, determinînd „putregaiul uscat". Inițierea atacului fungic al lemnului se realizează într-o zonă cu un conținut mare în apă. Creșterea hifelor este asociată cu utilizarea nutrienților și a energiei prin producerea de rizomorfe și extinderea infecției lemnului la o distanță de mai mulți metri față de colonie. Deși rizomorfele pot transporta apa, aceasta poate fi produsă local, la situsul de acțiune, prin utilizarea lemnului și degradarea lui cu producere de $CO_2$ și $H_2O$. Această apă apare sub forma unor picături de lichid pe miceliu, de unde și denumirea de *M. lacrymans*.

*Temperatura* are un efect mai puțin marcat. Deși majoritatea microorganismelor biodegradative sînt active, în special la 20°C, există numeroase cazuri de specii active la temperaturi extreme, la care determină pagube economice enorme. Astfel, *Cladosporium* sp. și *Sporotrichum* sp. sînt active la + 4°C, degradînd alimentele conservate prin frig. În plus, unele bacterii și microfungi termofili pot genera procese de termogeneză (60—80°C) în depozitele de cereale, de gunoi de grajd, de cărbune și turbă, în clăile de fîn etc.

*Influența condițiilor de mediu* asupra proceselor de biodeteriorare este pregnant evidențiată de cazul picturilor murale din peștera Lascaux (Dordogne), datînd din Paleolitic. Schimbarea marcantă a condițiilor de mediu, prin introducerea ei în circuitul turistic, a determinat schimbarea brutală a condițiilor de microclimat, contaminarea cu diferite microorganisme și apariția unor modificări de culoare, descrise sub denumirea de „boala verde" („Maladie verte de Lascaux"). Examenul direct a evidențiat prezența cianobacteriei *Oscillatoria*, pentru ca, ulterior, să se evidențieze o contaminare complexă cu bacterii *(Eubacteriales, Actinomycetes)*, alge verzi *(Palmellococcus* sp., *Stichococcus* sp.), *Xanthophyceae (Chlorobotrys)* și protozoare *(Amoebae, Ciliatae* și *Flagelatae)*.

Biodeteriorarea picturilor este consecutivă multiplicării microorganismelor heterotrofe, din solul și de pe pereții peșterii, precum și a unora alohtone, provenite de la exterior. Ele au utilizat substanțele organice contaminante prezente inițial pe pereți, îmbogățite cu biomasa bacteriană, algală și a protozoarelor bacterivore după moartea acestora (Lefévre și Laporte, 1969).

# ACTIVITATEA MICROORGANISMELOR ASUPRA HIDROCARBURILOR
# BIODEGRADAREA PETROLULUI

**„Înțelegerea proceselor de biodegradare microbiană a hidrocarburilor în mediu va face posibilă nu numai elaborarea unui model de prognoză asupra soartei hidrocarburilor poluante, ci și dezvoltarea de strategii privind utilizarea activității degradative a microorganismelor pentru îndepărtarea lor din ecosistemele contaminate".**

R. M. ATLAS

Numeroase microorganisme au capacitatea de a utiliza hidrocarburile gazoase, lichide și solide din seria alifatică, aromatică și asfaltică drept unică sursă de carbon și energie, descompunîndu-le la compuși cu greutate moleculară mai mică sau chiar la $CO_2$ și apă.

Răspîndite larg în mediile naturale și uneori semnificative numeric, microorganismele active (bacterii, inclusiv cianobacterii și actinomicete, levuri și fungi filamentoși) atacă diferiți compuși ca petrolul, gazolina, kerosenul, uleiurile minerale, parafina, gazul de iluminat, gazele de sondă, cauciucul natural și sintetic, uleiurile de răcire, suprafețele asfaltate, conductele subterane („pipe-line") și cablurile electrice protejate de coroziune cu ajutorul materialelor impregnate în parafine, elastomerii sau diferiți derivați ai hidrocarburilor (ZoBell, 1946; Atlas, 1981; Clarke, 1980).

Primele observații asupra acestui proces datează din anul 1895, cînd Miyoshi a observat că straturile subțiri de parafină — considerată biologic inertă — sînt pătrunse de hifele de *Botrytis cinerea*. Ulterior, Rahm (1906) a demonstrat că mai mulți microfungi din sol, inclusiv *Penicillium glaucum*, pot ataca parafina, descompunînd-o și utilizînd-o ca unică sursă de energie.

Importanța fenomenului în natură a fost semnalată de Seyer (1933) și de Chibnall și colab. (1934), pe baza frecvenței ridicate a microorganismelor active în sol și a incapacității de acumulare a unor hidrocarburi sintetizate de plante (avînd $C_7H_{16}$ pînă la $C_{35}H_{72}$) sau a unor ceruri produse de insecte.

## Biodegradarea țițeiului

Degradarea microbiană a țițeiului în ecosistemele naturale reprezintă un caz particular al activității microorganismelor, numite de Ahearn (1973) hidrocarbonoclastice. Este un proces complex, a cărui evoluție depinde de natura și de proporția relativă a diferiților constituenți din petrol, de natura comunităților de microorganisme caracteristice mediilor naturale și de o serie de factori de mediu care influențează activitatea acestora.

Deși fenomenele de poluare cu țiței sînt frecvente în sol, ca și în apele dulci, cele mai multe studii au fost focalizate pe mediul marin în care au loc cele mai masive și mai impresionante deversări prin efectele lor brutale asupra organismelor și asupra mediului însuși (Atlas, 1977, 1981).

### Compoziția chimică a țițeiului

Țițeiul este un amestec extrem de complex de hidrocarburi însumînd sute de compuși individuali cu structură chimică și greutate moleculară diferite la care se adaugă o serie de compuși cu greutate moleculară mai mică diferiți de hidrocarburi (fenoli, tioli, acizi naftenici, compuși heterociclici cu N (piridine, piroli, indol etc.), compuși ai S (alchil tioli, tiofen etc.).

Țițeiul brut conține mai multe clase de hidrocarburi atacabile în diferite grade de microorganisme:

1) *Fracțiunea alifatică (saturată)* este reprezentată de alcani compuși saturați cu formula generală ($C_nH_{2n} + 2$). Ea cuprinde substanțe cu moleculă lineară (*n* — alcani) ramificată (izoalcani) sau ciclică (cicloalcani sau naftene). În general, hidrocarburile cu lanț lung sînt atacate mult mai ușor decît cele care au numai cîțiva atomi de C per moleculă. Fenomenul este ilustrat de faptul că metanul ($CH_4$), etanul ($C_2H_6$) și propanul ($C_3H_8$) sînt oxidate mult mai lent și numai de un număr limitat de microorganisme, comparativ cu cerurile parafinice ($C_{20}H_{42} - C_{40}H_{82}$). De asemenea, moleculele lineare sînt atacate mai ușor decît cele ramificate sau ciclice.

2) *Fracțiunea aromatică* este reprezentată de compuși aromatici nesaturați, dintre care cel mai simplu este benzenul. Ceilalți compuși aromatici conțin unul sau mai multe cicluri benzenice. În funcție de bogăția în molecule cu greutate moleculară mare, ei formează proporții caracteristice pentru petrolul greu (mai vîscos) sau ușor.

În general, compușii aromatici sînt mai greu atacați, în procesul de biodegradare cea mai grea etapă fiind cea de clivare a ciclului (pentru ciclul benzenic necesită 800 de unități energetice, pentru pinem 1489 de unități ș.a.m.d.; ZoBell, 1954). Cu toate acestea, degradarea benzenului și a derivaților săi (toluenul și xilenul) a fost descrisă încă din primele studii, de către Störmer (1908), prin acțiunea bacteriei *Bacillus hexacarbovorum* * și respectiv de Wagner (1914) prin *Bacterium benzoli* *.

3) *Fracțiunea asfaltică* include componenți cu structură complexă, mai puțin cunoscuți din punct de vedere chimic, mai greu de degradat și de studiat (Atlas, 1981).

## DEGRADAREA HIDROCARBURILOR DIN PETROL ÎN NATURĂ

Poluarea mediilor naturale (ape dulci, mări, sol) cu țiței este foarte frecventă și este, uneori, impresionantă prin masivitatea sa și efectele brutale produse. Se apreciază că anual ~ 3,2 milioane tone petrol sînt eliminate pe diferite căi în oceane.

---

* Nomina incerta, nomina confusa.

Din punct de vedere ecologic există două tipuri de poluare:

1) *Eliminările lente*, slabe, cronice, relativ continue sau cu periodicitate mai mult sau mai puțin regulată, uneori imperceptibile, cărora li se adaugă contaminări mai masive asociate cu diferite activități umane: din rafinăriile de pe țărmul mării, din rîurile contaminate, din emisari industriali sau orășenești etc.

În această categorie se înscriu, de asemenea, după Nounou (1979), scurgerile accidentale de rutină din porturi și platformele de extracție marină și, mai ales, descărcarea în larg a apei de balast care antrenează țițeiul rezidual din tancurile petroliere ale navelor.

Se adaugă, de asemenea, anual, reîntoarcerea din atmosferă a 600 000 tone hidrocarburi, provenite inițial de pe pămînt. Ele sînt deosebit de importante, deoarece conțin compuși aromatici volatili (1 400 tone benzopiren/an), adesea cancerigeni și 50 000 tone/an „scurgeri naturale" din fisuri.

În sfîrșit, Wilson și colab. (1974) apreciază, pe bază de calcul, la 600 000 tone/an infiltrațiile de țiței brut, care pătrund în mare pe calea unor fisuri din rocile subacvatice din fundul mărilor și oceanelor.

Ansamblul acestor modalități de poluare însumează peste 90% din cantitățile de hidrocarburi deversate în mediul marin.

2) *Deversările cu caracter brusc și masiv*, accidentale, cu aspect dramatic, consecutive accidentelor navelor petroliere sau ale platformelor de foraj maritim, însumează, în mod paradoxal, numai 6% din total. Ele s-au produs cu o frecvență mare în ultimele decenii, fiind asociate cu deversările masive de țiței. Accidentul navei Amoco Cadiz (1978), produs la 200 km de coasta bretonă, a fost asociat cu eliminarea a 220 000 tone țiței brut, într-o perioadă de două săptămîni.

### Evoluția procesului de biodegradare

După deversările masive în mări sau oceane, procesul de degradare și de restabilire a echilibrului ecologic evoluează în trei faze:

**Faza întîia**, critică, cu o durată variind de la cîteva ore la cîteva zile, corespunde etalării rapide a țițeiului pe o suprafață mare a mediului marin, fiind asociată cu procese fizice (evaporare, dizolvare, emulsionare) cu importanță esențială pentru evoluția procesului de biodegradare.

Evaporarea în atmosferă este variabilă, în funcție de particularitățile poluantului (densitate, vîscozitate, tensiune superficială, proporția hidrocarburilor volatile etc.), precum și de condițiile de mediu (vînt, valuri, curenți, temperatura aerului și a apei etc.). Datorită acestor factori, cantitatea evaporată variază între 10% pentru petrolul „greu" și pînă la 75% pentru cel ușor.

În această fază, poluantul se separă în două structuri diferite fizico-chimic:

1) *Stratul superficial*, care conține fracțiunile cele mai ușoare, formează o peliculă lucioasă la suprafața apei. Ea are o serie de efecte negative prin faptul că modifică acțiunea valurilor, încetinește evaporarea, reține și concentrează poluanți chimici, detergenți, metale grele și chiar microorganisme. În foarte multe cazuri, concentrația substanțelor toxice este dăunătoare microorganismelor (concentrația Hg în stratul superficial poate fi de trei sute de mii de ori mai mare decît în coloana de apă).

Un alt inconvenient, legat de prezența acestui strat de suprafață decurge din posibilitatea fragmentării lui și transportului la distanțe mari, purtat de vînt și curenți. În plus, sub acțiunea vîntului se pot forma aerosoli care pot fi purtați pe distanțe de sute de km și depuși pe recolte (Nounou; 1979).

2) Țițeiul prezent în *coloana de apă* este supus unui proces de emulsionare caracteristic ecosistemelor acvatice.

Descris de Gutnick și Rosenberg (1975) ca o „pseudosolubilizare", acest proces are o importanță fundamentală pentru biodegradare. El se poate realiza sub două forme:

a) *Emulsia ulei în apă* se produce la suprafață și este dispersată de valuri și de curenți la distanțe mari.

Emulsionarea naturală este determinată de compuși cu proprietăți tensioactive marcate, care formează o fracțiune puțin însemnată cantitativ din compoziția petrolului. Diferitele particule fine prezente în suspensie în apa oceanului (oxizi, hidroxizi, carbonați etc.) favorizează stabilizarea emulsiilor.

b) *Emulsia apă în ulei* determină efectul denumit al „spumei de ciocolată" („Chocolate mousse effect"), reprezentat de formarea unei spume heterogene din punct de vedere fizic și chimic, care conține hidrocarburi cu greutate moleculară mare și o mare cantitate de apă de mare (pînă la 80%). Formarea spumei este determinată de mecanisme biotice și abiotice, respectiv de intervenția unor fenomene de fotooxidare (Burwood și Speers, 1974).

În unele cazuri, spuma poate forma, prin emulsionare fină, picături foarte mici, sensibile la degradarea bacteriană. În altele însă, poate produce mari acumulări de ulei emulsionat sub forma unor placarde de spumă sau a unor agregate globulare (engl. „Globs"), care pot avea pînă la 1 m diametru (Atlas, 1981). Hidrocarburile prezente în interiorul lor sînt apărate de acțiunea microorganismelor în așa fel, încît aceste acumulări masive de „spumă" pot rămîne nemodificate chiar după doi ani de la formarea lor (Davis și Gibbs, 1975).

În cursul acestor procese, o parte din constituenți sedimentează și se depun pe fundul oceanului, unde pot determina efecte negative asupra microorganismelor bentonice. Adsorbția lor pe nisip sau îngroparea în sedimente are consecințe negative, întîrziind biodegradarea și prelungind efectele toxice.

**Faza a doua de degradare a hidrocarburilor** se realizează pe două căi diferite:

1) *Biodegradarea* este realizată în ecosistemele acvatice în special de bacterii, cărora li se adaugă o serie de fungi și unele alge.

Deși microorganismele care degradează hidrocarburile sînt ubicvitar prezente, mai mulți cercetători semnalează faptul că cele izolate din zonele permanent poluate (spre exemplu, din porturi) au proprietăți diferite de echivalenții lor proveniți din apele curate și sînt mai bine adaptate să degradeze țițeiul.

Nounou (1979) semnalează faptul că unele organisme planctonice (fito-, zooplancton și chiar unele bacterii) înmagazinează temporar hidrocarburi, sub formă de picături, pe care le elimină netransformate în mediu.

În sfîrșit, unele organisme animale (anelide, polichete, pești, păsări) pot degrada o parte din hidrocarburile absorbite prin activarea unei enzime de detoxificare — aril-hidrocarburi-hidroxilază.

2) *Degradarea chimică* (abiotică) se realizează în absența luminii, prin fenomene de *autooxidare* (care au o importanță minoră din cauza temperaturii scăzute a mediului oceanic) și prin *fotooxidare*, respectiv prin fotoliză cu ajutorul radicalilor liberi foarte reactivi, a căror combinare rapidă duce la formarea unui număr mare de compuși chimici (polimeri, produși aromatici oxidați etc.). Acești compuși, uneori mai toxici decît cei din care provin, sînt, de regulă, mai solubili și mai ușor accesibili atacului microorganismelor. Prezența $H_2S$ pledează pentru intervenția unor procese determinate de microorganisme asociate fotooxidării.

Degradarea prin fotooxidare este destul de semnificativă, ea ducînd în opt zile de însorire normală la degradarea unui strat de țiței gros de 2,5 mm, echivalent cu 2 000 kg/km². După Atlas și Bartha (1987), fotooxidarea ar putea degrada în opt ore de expunere la soare 0,2 tone de țiței/km².

În această fază se poate observa prezența unor agregate cvasistabilizate de gudron (engl. „Tar bolls"; fr. „Boules de goudron") (Butler, 1973), care conțin hidrocarburi cu greutate moleculară mare (pînă la $C_{40}$), oxigenate, azotate sau sulfuroase, și compuși minerali (35%), în special oxizi de fier. Neatacabile de către microorganisme, ele plutesc de-a lungul căilor de trafic marin sau sînt depuse pe țărm.

**Faza a treia**, de restabilire a echilibrului ecologic, are o durată variabilă, în funcție de intensitatea poluării și de condițiile în care a evoluat biodegradarea. Ea corespunde situației în care majoritatea hidrocarburilor au fost degradate și îndepărtate, cantitățile minore rămase fiind regăsite în diferite compartimente ale mediului marin: depuse în sediment sau acumulate temporar în unele organisme vii etc.

### Importanța dispersiei țițeiului

Starea fizică a poluantului are un rol esențial în procesul de biodegradare. Emulsionarea hidrocarburilor mărește suprafața de atac a microorganismelor și accesibilitatea enzimelor. Gradul de dispersie determină, pentru aceeași cantitate de țiței, mărimea suprafeței care poate fi colonizată de microorganismele specifice, ce acționează, după cum s-a demonstrat, numai la interfața apă/țiței. În plus, în ecosistemele acvatice, deplasarea picăturilor de țiței emulsionate în coloana de apă favorizează accesul microorganismelor legate de ele la nutrienți și oxigen.

În cazurile în care dispersia este redusă, cum sînt mediile cu temperaturi scăzute, în sol, sau datorită absorbției și adsorbției pe resturile vegetale și pe particulele de sol, viteza de biodegradare este limitată semnificativ.

În mediul marin, adsorbția pe particulele inerte, fine, favorizează degradarea, în timp ce legarea de particulele mari determină sedimentarea.

## BIODEGRADAREA HIDROCARBURILOR DIN ȚIȚEI, ÎN SOL

Microorganismele hidrocarbonoclastice sînt active în cele mai multe soluri. Ca dovadă, hidrocarburile alifatice produse de plante, ca și cerurile de la insecte (cu $C_7H_{16} \rightarrow C_{35}H_{72}$) nu se pot acumula.

Efectele poluării solului cu țiței sînt variabile în funcție de cantitatea și compoziția sa, de natura solului, de tipul de vegetație etc. În anumite condiții, cantitățile foarte mici de hidrocarburi pot fi chiar benefice pentru fertilitate: tratarea solului cu cantități mici de toluen determină inițial o scădere temporară a numărului de microorganisme, urmată de o creștere de la nivelul inițial de $5 \times 10^6$/g la $40 \times 10^6$/g. Fenomenul are la bază faptul că numeroase microorganisme din sol pot folosi ca sursă de C și energie toluenul, ca și alți compuși (xilen, naftalen, hexan, clorbenzen, nitrobenzen, crezoli etc.).

Deversarea de țiței brut în sol are drept rezultat o creștere numerică a populațiilor de bacterii, cu o reducere concomitentă a diversității lor, respectiv cu predominanța speciilor care degradează hidrocarburile la compușii mai simpli, determinînd dispariția lor treptată. După administrarea experimentală a 200 g țiței în 4 000 g sol s-a constatat dispariția a 50%, prin biodegradare, după 56 de zile.

Poluarea cu doze mari omoară vegetația, dar, totdeauna, în special în condiții de aerobioză, în perioade mai mult sau mai puțin îndelungate au loc degradarea și revenirea la normal.

## MICROORGANISMELE CARE DEGRADEAZĂ HIDROCARBURILE

**„Hidrocarburile sînt compuși organici care au apărut în mod natural. De aceea, nu este deloc surprinzător faptul că au evoluat și o serie de microorganisme care au capacitatea de a le utiliza"**

R. M. ATLAS

Capacitatea de a utiliza hidrocarburile este larg răspîndită în lumea microorganismelor, fiind întîlnită la bacterii (inclusiv la actinomicete și cianobacterii), la levuri, la fungi filamentoși și la alge. Prezente în sol, în apele dulci și marine, și în unele sedimente, într-o gamă largă de condiții de mediu, aceste microorganisme au capacitatea de a sintetiza un spectru larg de enzime, care asigură degradarea hidrocarburilor individuale și potențialul de îndepărtare sau de conversie a țițeiului din mediu. Una dintre sursele cele mai adecvate pentru izolarea lor o constituie solul sau apa poluată cu reziduuri petroliere sau reziduuri de pe fundul bazinelor de sedimentare, unde pot ajunge de la cîteva sute de mii la cîteva milioane pe ml.

Microorganismele care degradează hidrocarburile aparțin la peste 100 de specii și 30 de genuri. Cel mai frecvent izolate sînt următoarele:

**Bacterii:** *Achromobacter, Acinetobacter, Actinomyces (A. asteroides, A. farcinica, A. gypsoides), Alcaligenes, Artrobacter, Bacillus (B. lipolyticum), Corynebacterium (C. simplex), Brevibacterium, Flavobacterium, Micrococcus (M. paraffinae), Mycobacterium (M. phlei, M. lacticola, M. luteum, M. rubrum), Nocardia, Pseudomonas (P. aeruginosa, P. fluorescens liquefaciens, P. striata, P. borcopolis), Proactinomyces (P. paraffinae, P. agrestis, P. polychromogenes, P. corallinus), Spirillum, Vibrio* etc. Se adaugă bacteriile foto-

sintetizante din genurile *Rhodopseudomonas* și *Rhodospirillum*, care degradează țițeiul în condiții de anaerobioză strictă și iluminare slabă (Evans, 1963).

**Cianobacterii**. Capacitatea de a oxida hidrocarburile aromatice pare să fie larg răspîndită la cianobacterii. Cele mai active sînt: *Anabaena, Aphanocapsa, Coccochloris, Microcoleus, Nostoc, Oscillatoria*.

**Levuri**: *Candida, Rhodotorula, Rhodospirillum, Saccharomyces, Sporobolomyces* etc.

**Fungi filamentoși**: *Aspergillus (A. flavus, A. effusus, A. tumari, A. oryzae, A. versicolor), Acremonium, Cladosporium (C. resinae), Fusarium, Graphium, Gliocladium, Paecilomyces, Penicillium, Mortierella, Trichoderma, Trichosporium, Sphaeropsidales* etc. (Walker și colab., 1975).

**Alge**: *Amphora, Chlorella, Chlamydomonas, Cylindrotheca, Dunaliella, Petalonia, Porphyridium, Ulva* etc.

Numărul microorganismelor care degradează hidrocarburile crește foarte mult după poluare, cu cîteva ordine de mărime, și se menține ca atare uneori mai mult de un an.

În sol, după contaminare, fungii care degradează hidrocarburile reprezintă 60—82% din microbiota fungică, iar bacteriile 50% din micropopulația respectivă. Bacteriile din genul *Pseudomonas* pot reprezenta 66% din total.

În mări și oceane, numărul microorganismelor respective este de 10—100 de ori mai mare în straturile superioare ale apelor poluate decît la adîncimea de 10 cm.

În timp ce în ecosistemele nepoluate, numărul microorganismelor care utilizează hidrocarburile poate fi mai mic de 0,1% din total, în cele poluate poate ajunge pînă la 100% din numărul microorganismelor viabile.

În general, se consideră că densitatea populațiilor de microorganisme care degradează hidrocarburile și proporția lor în comunitățile naturale de microorganisme reprezintă un indicator sensibil al expunerii mediului respectiv la acești compuși. Gradul de depășire a nivelului normal (nepoluat) reflectă, adesea, cantitativ, gradul de expunere a ecosistemului la poluarea cu hidrocarburi.

Potențialul de biodegradare variază, în primul rînd, în funcție de tipul și de greutatea moleculară a hidrocarburilor. Alcanii cu lanțuri scurte sînt toxici pentru microorganisme, dar, în genere, sînt ușor volatili. Cei cu lanț lung devin progresiv mai rezistenți, pentru ca la g.m. 500—600 dal să nu mai poată fi utilizați ca sursă de C și energie. Cel mai rapid sînt degradați n-alcanii cu lungime intermediară ($C_{10}$ — $C_{24}$) (Atlas și Bartha, 1987). Ramificarea catenelor are drept consecință reducerea vitezei de biodegradare, iar compușii aromatici sînt degradați cel mai lent, datorită complexității mecanismelor biochimice.

Potențialul de biodegradare este adesea exprimat prin date contradictorii, decurgînd din lipsa de fiabilitate a criteriilor de apreciere și a variabilității condițiilor locale. Temperatura scăzută, sărăcia în nutrienți minerali (N și P), deficitul de $O_2$, iar în apele din largul oceanelor (anterior nepoluate) raritatea microorganismelor hidrocarbonoclastice sînt tot atîtea condiții care încetinesc ritmul biodegradării.

În general, potențialul de revenire la normal este considerat ca foarte mare (Clarke, 1980), chiar în cazul unor zone recunoscute ca sediul unor contaminări importante ca, de exemplu, regiunea situată la nord la Santa

Barbara, S.U.A., unde petrolul depus la suprafața apei este degradat și „măturat" spre țărm, fără să se acumuleze și fără efecte nocive asupra vieții din mare.

Deversările masive și cele ce se produc continuu sau cu periodicitate mare depășesc capacitatea de biodegradare a microorganismelor din mediile naturale.

Aminot (1980) a urmărit biodegradarea țițeiului deversat accidental din petrolierul Amoco Cadiz (1978), constatînd că, după două săptămîni, 9 000 tone, din cele 220 000 deversate, au fost biodegradate în coloana de apă. Dezvoltarea microorganismelor hidrocarbonoclastice a determinat epuizarea N, P și $O_2$ în coloana de apă situată sub stratul de țiței. Deși degradarea a fost foarte rapidă, amploarea poluării a făcut ca țițeiul să persiste vreme îndelungată, în special în zona litorală. Condițiile care măresc gradul de aerare (acțiunea valurilor, curenții), ca și furnizarea de nutrienți accelerează viteza de biodegradare.

În schimb, țițeiul care a fost îngropat în nisip, cel din sedimentele anoxice sau acumulat în golfuri este cel mai rezistent la degradare și persistă timp îndelungat (Boehm și Fiest, 1980; Atlas, Boehm și Calder, 1981).

În afara efectelor vizibile, alarmante, ce însoțesc marile deversări accidentale de țiței (moartea păsărilor, a peștilor etc.), se adaugă o serie de fenomene de extremă gravitate existente chiar în cazul contaminărilor mai mici și, ca urmare, frecvent ignorate: 1) perturbarea chemorecepției animalelor marine (chiar în prezența unor cantități foarte mici de hidrocarburi (ppm), cu consecințe negative asupra hrănirii și reproducerii, putînd duce pînă la eliminarea unor specii din regiunile afectate; 2) introducerea în lanțul trofic și, pe această cale, în organismele marine a unor compuși cancerigeni rezistenți la biodegradare (Nounou, 1979).

Dibble și Bartha (1979) au urmărit ritmul de restabilire a echilibrului ecologic în solurile poluate, prin monitorizarea timp de doi ani a unui teren agricol (1,50 ha) cultivat inițial cu grîu. După contaminarea accidentală cu 1,9 milioane tone de kerosen, datorită biodegradării și tehnicilor de tratare (arat repetat, fertilizare etc.), după un an „era aproape de starea normală productivă", iar după doi ani hidrocarburile au scăzut la un nivel nesemnificativ.

Atlas și Bartha (1987) estimează pagubele economice determinate de poluarea cu petrol la 10—15 $ pentru fiecare galon (3,785 l) deversat.

### Factorii de mediu care influențează biodegradarea hidrocarburilor

Soarta hidrocarburilor deversate în mediile naturale depinde, în mare măsură, de o serie de factori abiotici care afectează modificarea și biodegradabilitatea lor. Ei influențează viteza de creștere a microorganismelor și activitatea enzimelor. Persistența poluantului depinde nu numai de cantitatea și calitatea amestecului de hidrocarburi, ci și de proprietățile ecosistemului afectat. De aceea, în anumite condiții, hidrocarburile din petrol pot persista numai cîteva ore sau cîteva zile, în timp ce în altele par să persiste indefinit.

**Temperatura.** Efectele temperaturii se manifestă prin interacțiune cu alți factori, ca natura și calitatea amestecului de hidrocarburi, compoziția comunităților de microorganisme etc.

Importanța deosebită a temperaturii asupra microorganismelor este în parte atenuată în cazul mediilor naturale (sol, mare etc.) de prezența diferitelor categorii de microorganisme adaptate la condițiile respective (criofile, mezofile, termofile). Datorită acestui fapt, biodegradarea diferitelor categorii de hidrocarburi a fost demonstrată și la 0°C, dar și la 47°C și chiar la 60°C. Cele mai multe date experimentale au fost obținute la temperaturi cuprinse între 25 și 37°C.

Ca regulă generală, temperaturile mici întîrzie viteza de volatilizare a hidrocarburilor cu greutate moleculară mică, dintre care unele sînt toxice pentru microorganisme. De asemenea, în regiunile reci, vitezele de degradare sînt mult mai mici și, în consecință, mai puțin adecvate îndepărtării țițeiului din mediu.

Unele microorganisme marine oxidează la 55°C de șapte ori mai multe parafine decît la 22°C (ZoBell, Grant și Hess, 1943).

**Salinitatea și presiunea hidrostatică.** Influența acestor factori a fost studiată, în special, în raport cu condițiile specifice mediilor acvatice.

În mediile hipersaline, viteza metabolismului microorganismelor active este mult diminuată și, în consecință, biodegradarea hidrocarburilor este redusă la limite imperceptibile.

În mod asemănător, presiunile mari încetinesc foarte mult viteza de degradare. Astfel, în timp ce la presiunea de 1 bar, 94% din cantitatea de hexadecan expusă acțiunii microorganismelor este degradată în opt săptămîni, la 500 de bari, același proces necesită 40 de săptămîni (Schwartz, Walker și Colwell, 1975). Fenomenul este important, deoarece o parte din hidrocarburile care poluează apele oceanului au tendința să se depună în sedimente, ceea ce are drept consecință o foarte îndelungată persistență la nivelul acestora.

**Oxigenul.** Biodegradarea țițeiului este deosebit de activă în aerobioză, fapt explicabil deoarece toate căile biochimice cunoscute funcționează cu participarea oxigenazelor și a oxigenului molecular.

După ZoBell (1969, 1971), oxigenul prezent în 320 000 l de apă de mare este suficient pentru oxidarea unui litru de țiței. Floodgate (1979), pe baza unor calcule teoretice, apreciază că oxidarea a 3,5 g petrol necesită consumul unui gram de $O_2$.

În bazinele acvatice anoxice și în hipolimnionul lacurilor stratificate, ca și în sedimentele bentonice, lipsa oxigenului limitează foarte mult biodegradarea. După unii cercetători, în anumite sedimente anoxice, rata biodegradării este atît de redusă încît petrolul poate persista practic indefinit ca un contaminant. După Atlas (1981), în sedimentele anaerobe, introducerea de $O_2$ prin acțiunea viermilor policheți este foarte importantă pentru creșterea vitezei de biodegradare.

**Nutrienții.** Rolul nutrienților, în special al surselor de N și P, este controversat: unii cercetători îi consideră ca factori limitanți ai biodegradării, alții nu. Explicația acestor puncte de vedere contradictorii rezidă în natura diferită a hidrocarburilor expuse biodegradării.

În general, se consideră că în cazul poluării realizate cu cantități relativ mici de hidrocarburi solubile, N și P nu au caracter limitant. Solubilitatea hidrocarburilor este atît de mică încît împiedică stabilirea unui raport nefavorabil C/N sau C/P. Ca urmare, în aceste cazuri, nutrienții disponibili sînt suficienți pentru a asigura biodegradarea.

În cazul marilor deversări de țiței, cum este cazul celor determinate de accidentele supertancurilor petroliere, cantitățile de N și P din apa de mare sînt limitante pentru biodegradare. În aceste cazuri, nevoile de N și P sînt variabile în funcție de natura (și proveniența) hidrocarburilor din țiței. Astfel, Bridie și Bos (1971) au demonstrat că biodegradarea cu viteză maximă a țițeiului brut din Kuweit în apa de mare (la o concentrație de 70 mg țiței/l) necesită 3,2 mg $NH_4^+$ și 0,6 mg fosfat. În cazul țițeiului iranian, concentrația N și P optimă pentru biodegradare în apa din Marea Mediterană este de 11 mg și respectiv 2 mg/l (Reisfeld și colab., 1972).

În concluzie, se poate spune că N și P în concentrațiile disponibile în mod normal în apa de mare limitează viteza de biodegradare a hidrocarburilor după poluările masive. În aceste cazuri, viteza de refacere a rezervelor de N și P este prea lentă față de necesitățile biodegradării eficiente. De aceea, adăugarea unor cantități adecvate de N și P (sub formă de fertilizatori) exercită un rol stimulator asupra biodegradării (Le Petit și N'Guyen, 1976).

## BIODEGRADAREA STIMULATĂ A ȚIȚEIULUI

Studiul proceselor de biodegradare a țițeiului în condiții stimulate în laborator, ca și în natură a demonstrat dependența lor de condițiile de mediu și de prezența și activitatea microorganismelor hidrocarbonoclastice.

În unele ecosisteme naturale (medii de apă dulce sau marină, sol), deși comunitățile de microorganisme hidrocarburoclastice sînt prezente și teoretic capabile să biodegradeze extensiv țițeiul, nu își pot exercita activitatea datorită condițiilor de mediu nefavorabile (Westlake și colab., 1974; Atlas, 1971).

În alte situații controlate, adăugarea de microorganisme active, fără modificarea condițiilor de mediu, s-a dovedit ineficientă.

Pornind de la aceste observații au fost imaginate o serie de măsuri de stimulare a biodegradării — adecvate mediului care urmează a fi tratat. Metodele de modificare a mediului sînt variabile, în funcție de particularitățile locale.

**Oxigenarea.** Pornind de la observația că biodegradarea eficientă a țițeiului necesită oxigen molecular (Floodgate, 1972) au fost propuse o serie de măsuri de stimulare prin aerare intensă. Astfel, aerarea forțată, foarte eficientă pentru tancurile cu apă de balast ale vapoarelor (Rosenberg și colab., 1975) poate fi folosită pentru a furniza oxigen în lagune și în unele medii cu apă dulce (Atlas, 1977). În cazul solurilor, aratul repetat îmbunătățește, de asemenea, gradul de aerare și favorizează biodegradarea.

**Nutrienții anorganici.** Creșterea microorganismelor necesită cantități relativ mai mari de N și P, și cantități mai mici de S, Fe, Mg, Ca, Na și alte elemente. Disponibilitatea lor în diferite medii este variabilă ca și ușurința cu care pot fi adăugați pentru a stimula biodegradarea.

În sistemele închise, nutrienții minerali (respectiv N și P) pot fi adăugați sub formă de soluții apoase de fosfat de $NH_4$, iar în sol sub formă de fertilizatori azotați sau fosfatici (Rosenberg și colab., 1975). În bazinele acvatice și în mediile marine oligotrofe, concentrația compușilor cu N și P în apele de suprafață este prea mică pentru a asigura degradarea microbiană extensivă a țițeiului.

S-a sugerat ca administrarea lor să fie făcută în forme care nu permit disiparea la interfața apă/țiței.

Gholson, Guire și Friede (1972) au propus administrarea fertilizatorului cu azot și fosfor încapsulat într-o matrice, care îi permite să plutească și din care este eliminat lent.

Atlas și Bartha (1973) optează pentru utilizarea unor surse de N și P oleofile (uree parafinizată și octil-fosfat), care rămîn la interfața apă/țiței și induc o stimulare a degradării cu 30 — 40% mai mare decît cea din regiunile martor.

Dibble și Bartha (1976) au utilizat, pentru a asigura stimularea microorganismelor din mediul oceanic, fertilizatori pe bază de fier oleofil și octoat feric.

În afară de prețul ridicat și de dificultățile de administrare, metodele citate nu sînt lipsite de inconveniente :

În mediile cu apă dulce, utilizarea lor poate determina apariția unei eutrofizări, cu creșterea excesivă a algelor și toate inconvenientele care decurg, și care pot depăși avantajele rezultate din stimulare.

În mediul marin există riscul unor influențe negative asupra resurselor piscicole, iar în sol cel al perturbării echilibrului microbiotei normale, cu creșterea excesivă a microorganismelor ce pot fi nocive pentru plante, recolte și chiar pentru animale.

### Metode de modificare a petrolului

**Compoziția chimică.** Unele probe de țiței conțin compuși chimici cu greutate mică și punct de fierbere scăzut, avînd acțiune toxică pentru microorganisme. Îndepărtarea lor prin încălzire temporară, combustia țițeiului sau aerare intensă artificială, practicate în unele sisteme închise, sînt greu de adaptat la condițiile mediilor naturale. Arderea, în special, îndepărtează componenții toxici și multe alte hidrocarburi, dar adesea țițeiul rezidual, rămas după ardere, poate fi mult mai rezistent la biodegradare.

**Modificarea stării fizice a țițeiului.** Deoarece multe dintre hidrocarburile din petrol nu sînt foarte solubile, în mediile acvatice biodegradarea are loc la interfața ulei/apă. În aceste condiții este evident că măsurile care măresc suprafața de atac a microorganismelor vor face țițeiul mai sensibil la biodegradare. De aceea, au fost propuse o serie de metode de mărire a suprafeței disponibile, prin emulsionare, dincolo de limitele care rezultă din tendința naturală a țițeiului de a se răspîndi pe suprafața ecosistemelor acvatice, într-o peliculă care adesea se apropie ca grosime de un monostrat.

**Detergenții.** Efectul favorabil al emulsionării țițeiului asupra biodegradării a stimulat utilizarea substanțelor tensioactive de tipul detergenților în vederea măririi gradului de dispersie. Rezultatele sînt contradictorii în sensul că dacă nu sînt toxici, detergenții măresc biodegradabilitatea și au și alte efecte benefice : împiedică formarea peliculei de suprafață care diminuă oxigenarea coloanei de apă subiacente, activează fragmentarea ei, dacă s-a format, diminuă riscul contaminării organismelor marine etc.

În același timp, au și o serie de efecte negative ca : distrug flora și fauna marină, uneori pe distanțe mari, măresc posibilitatea formării de picături de hidrocarburi cu particulele în suspensie, favorizînd astfel sedimentarea în forme greu degradabile a unor compuși care în mod normal s-ar volatiliza.

**Compușii tensioactivi de natură bacteriană.** Unele bacterii (*Arthrobacter* sp., *Corynebacterium*, precum și unele specii de *Pseudomonas*) produc substanțe de tipul acizilor grași, derivați ai acizilor grași sau polimeri cu structură complexă, care au un efect puternic emulsificator.

Reisfeld, Rosenberg și Gutnick (1972) au propus utilizarea lor pentru curățirea tancurilor de stocare a țițeiului de pe nave în cursul călătoriei de întoarcere spre porturile de încărcare. Experimental, adăugarea unor culturi mixte la 107 $m^3$ de apă de balast uleioasă depusă pe un strat gros de nămol de țiței (în prezența a 7,6 mM uree și 0,57 mM $K_2PO_4$) pentru a stimula creșterea bacteriilor, în condiții de aerare, a dus la dispariția totală a stratului de nămol după numai patru zile.

Tehnica ar putea fi generalizată, utilizînd tulpini cu proprietăți superioare obținute prin tehnici de inginerie genetică pentru a asigura curățirea rezervoarelor de pe nave și a împiedica poluarea mărilor cu apă de balast (Clarke, 1980).

## CONSTRUCȚIA DE BACTERII CU PROPRIETĂȚI DEGRADATIVE SUPERIOARE

**„Microorganismele dispun de întregul echipament necesar pentru a-și realiza propria inginerie genetică și au făcut-o cu succes, în condiții naturale, utilizînd mecanisme foarte sofisticate. De aceea, nu este nimic „nenatural" în ingineria genetică practicată de om și, ca atare, nu trebuie să avem temeri exagerate privind aplicarea acestei tehnologii".**

R. K. Jain
G. S. Sayler

Înțelegerea rolului bacteriilor în procesele de biodegradare a țițeiului în natură a avut, la scurt timp, drept urmare ideea utilizării unor tulpini cu activități biologice superioare. Teoretic, microorganismele ideale pentru acest scop trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

1) să degradeze intens și rapid o gamă cît mai mare de compuși din petrol;

2) să se reproducă rapid;

3) să se multiplice și în mediile naturale;

4) să fie genetic stabile și să poată fi conservate și recultivate fără a suferi modificări esențiale;

5) să nu producă efecte toxice și să nu fie patogene;

6) să poată fi utilizate în asociere cu alte microorganisme active, pentru a asigura degradarea diferitelor tipuri de hidrocarburi.

Perspectivele utilizării tehnicilor genetice convenționale și a celor de inginerie genetică sînt deosebit de mari, deoarece genele care codifică enzimele cu activitate biodegradativă sînt localizate pe plasmide catabolice *.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 74.

Tulpinile bacteriene individuale pot purta una sau mai multe plasmide diferite (tabelul nr. 68).

*Tabelul nr. 68*

**Exemple de bacterii purtătoare de plasmide catabolice ce codifică utilizarea unor substanțe chimice neobișnuite**

| Bacteria | Denumirea plasmidei | Substratul utilizat pentru creștere |
|---|---|---|
| *Pseudomonas putida* | p TOL (p WWO) | Toluen, m-xilen, |
| | p $DK_1$ | p-xilen |
| *Pseudomonas putida* | p NAH 7 | Naftalen |
| *Pseudomonas putida* | p SAL | Salicilat |
| *Pseudomonas putida* | p CAM | Camfor |
| *Pseudomonas putida* | p OCT | n-octan |
| *Acinetobacter* sp. $P_6$ | p KF 1 | 4-clorbifenil |
| *Alcaligenes* sp. $A_5$ | | |
| *Pseudomonas* sp. B 13 | p AC 25 | 3-clorbenzoat |
| *Acinetobacter paradoxus* | p JP 1 | 2,4-diclorfenoxiacetat |
| *Pseudomonas fluorescens* | fără denumire | Stiren |

Or, după cum este cunoscut, multe plasmide au caracter de conjugon, pot iniția și realiza mecanisme de transfer intraspecific, interspecific și intergeneric sau pot fi supuse unor procese de amplificare genică (mărirea numărului de plasmide per celulă bacteriană). Toate aceste comportamente duc, teoretic, la posibilitatea obținerii unor tulpini bacteriene cu proprietăți biodegradative superioare.

Kellogg, Chatterjee și Chakrabarty (1981), utilizînd un procedeu devenit clasic („Plasmid-assisted molecular breeding"), au cultivat în condiții de chemostat un amestec de tulpini bacteriene izolate din zone de deversare a hidrocarburilor. Tulpinile incluse conțineau o varietate de plasmide catabolice, dar nu puteau degrada acidul 2,4,5-triclorfenoxiacetic (2,4,5-T) *. După o co-cultivare prelungită (8 — 10 luni), au izolat bacterii care degradau activ 2,4,5-T. Microorganismele transformate genetic au apărut ca rezultat al unor reacții necaracterizate care s-au produs, în mod normal, între tulpinile bacteriene purtătoare de plasmide catabolice.

Utilizînd tehnici de inginerie genetică, Lehrbach și colab. (1984) au transferat la *Pseudomonas putida* $B_{13}$ fragmentele *xyl D* și *xyl L* ale plasmidei TOLpWWO, care codifică enzimele toluat-1,2-dioxigenaza și respectiv acid dihidroxibenzoic dehidrogenaza. Au obținut, în felul acesta, o bacterie reprogramată genetic, care se poate dezvolta pe 4-clorbenzoat și pe 3,5-diclorbenzoat. Studiile genetice efectuate pe *P. putida* au evidențiat existența unor tulpini individuale care au capacitatea de a degrada fie octanii, fie camforul, fie naftalenii. Nici o tulpină nu poate însă degrada toți compușii menționați.

* În mod normal, capacitatea de a utiliza 2, 4,5-T este codificată de o plasmidă prezentă la *Pseudomonas cepacia AC 1100*, care degradează într-o săptămână 98% din cantitatea de 2, 4, 5-T depus în sol.

Tehnicile de inginerie genetică permit construirea unor tulpini bacteriene care cumulează un număr mare de plasmide diferite sau de fragmente plasmidiale utile, putînd astfel să degradeze o gamă cît mai largă de hidrocarburi. În acest sens sînt de menționat lucrările lui Chakrabarty, Friello și Mylroie (1978), care au construit o „superbacterie" („Superbug") prin cumularea în celulele de *Ps. aeruginosa* a patru plasmide: *OCT* (care codifică metabolizarea hidrocarburilor octanice, hexanice și decanice), *XYL* (xilen și toluen), *CAM* (camfor) și *NAH* (naftelani). Plasmidele CAM și NAH au funcția de conjugoni. Final, bacteria conține trei plasmide: *XYL*, *NAH* și o plasmidă hibridă, derivată din combinarea unor fragmente din plasmidele *CAM* și *OCT*, care, fiind incompatibile, nu pot coexista separat în aceeași bacterie.

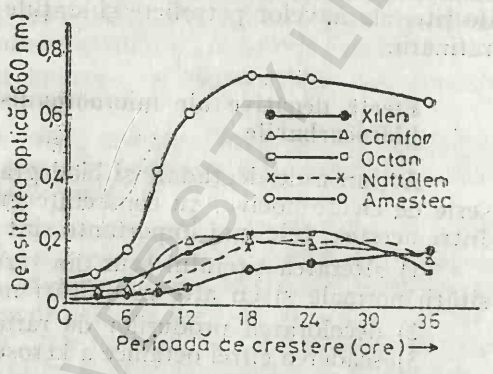



Fig. 346. — Creșterea bacteriei multiplasmidice *Pseudomonas aeruginosa* în prezența unor concentrații suboptimale (2,5 mM) de diferite hidrocarburi. Dezvoltarea este optimă într-un amestec ce conține 2,5 mM din fiecare hidrocarbură (după Chakrabarty, 1978).

Bacteria multiplasmidică se dezvoltă mai bine și mai rapid pe țiței pur, pe măsură ce numărul proceselor de biodegradare efectuate sub acțiunea plasmidelor crește cantitativ și ca varietate (fig. 346). Ea este mult mai eficientă decît tulpinile care conțineau o singură plasmidă, respectiv degradau o singură hidrocarbură.

Tulpinile astfel constituite au două utilizări potențiale:

1) Combaterea „mareelor negre" determinate de deversarea accidentală în mări și oceane a unor mari cantități de țiței din vapoare. Răspîndite din avion deasupra zonei calamitate, bacteriile multiplasmidice proliferează rapid și transformă țițeiul în proteine asimilabile de zooplancton, realizînd depoluarea mării și transformarea hidrocarburilor în hrană pentru fauna marină.

2) În biotehnologie, pentru debarasarea țițeiului brut de diferite hidrocarburi ciclice, aromatice sau policiclice, înainte de utilizarea lui pentru producerea de drojdii furajere.

Aplicarea bacteriilor reprogramate genetic în natură nu este lipsită de inconveniente, care pot influența eficiența lor. Ele țin de:

1) competiția cu microbiota oceanică normală, mai bine adaptată la mediul respectiv;

2) nevoia asocierii unor modificări fizice sau chimice ale mediilor naturale (aerare, îmbogățire în compuși cu N sau P);

3) existența unor compuși rezistenți sau „recalcitranți" la degradare, din categoria hidrocarburilor cu greutate moleculară mare, cu catene ramificate sau aromatice cu cicluri;

4) riscul ca degradarea hidrocarburilor simple și menținerea celor rezistente la degradare să creeze probleme noi;

5) diferențele de compoziție chimică a diferitelor sortimente de petrol provenite din diferite regiuni ale lumii (Atlas, 1977).

Datorită acestor dificultăți, Clarke (1980) consideră că utilizarea tulpinilor de bacterii hidrocarburoclastice reprogramate genetic este în mod particular indicată pentru sistemele închise, sau relativ închise, ca rezervoarele de țiței ale navelor petroliere și stațiile de tratare a apelor reziduale de la rafinării.

### Efecte negative ale microorganismelor care degradează hidrocarburile

Acțiunea de degradare și biodegradare a hidrocarburilor poate avea o serie de efecte nocive, cu consecințe grave din punct de vedere economic. Între acestea, cele mai importante sînt următoarele :

1) alterarea țițeiului brut din rezervoare asociată cu diminuarea densității normale și cu alte modificări nedorite ;

2) decolorarea produșilor de rafinare ;

3) scăderea cifrei octanice a kerosenului și gazolinelor utilizate în aeronautică ;

4) apariția de mirosuri dezagreabile și modificarea proprietăților fizico-chimice ale uleiurilor minerale folosite ca lubrefianți sau ca agenți de răcire ;

5) producerea de amestecuri explozive în tancurile de stocare a kerosenului sau gazolinei, prin formarea unui amestec de metan și $H_2$, rezultat din descompunerea kerosenului în contact cu apa.

În aceste condiții, se adaugă acțiunea bacteriilor nitrat reducătoare, care atacă kerosenul, și a celor sulfat reducătoare, care, pe lîngă efectul de coroziune, contaminează cu $H_2S$ kerosenul și gazolinele care conțin apă (ZoBell, 1946).

## BIODETERIORAREA CAUCIUCULUI

Considerat, în general, ca relativ inert, cauciucul sub diferitele sale forme (latex, cauciuc pur, comercial sau sintetic) este atacat lent de mai multe microorganisme, fapt confirmat inițial de Eaton și Granham (1915). Faptul că, deși materia primă este produsă de numeroase plante, nu se acumulează niciodată în natură, constituie o probă evidentă a degradării sale în condiții naturale.

Biodegradabilitatea cauciucului a fost demonstrată experimental de ZoBell (1944). El a evidențiat faptul că mici cantități de garnituri de cauciuc, suspendate în apă cu citrat de Mg (în absența altor surse de C și energie), menținute 5—10 zile la 25°C, determină o scădere a concentrației oxigenului dizolvat.

Natura biologică a procesului este probată de suprimarea lui în mediile cu substanțe chimice antimicrobiene, ca și în cele sterilizate termic.

Latexul este produs de numeroase specii de *Euphorbiaceae, Moraceae* sau *Apocyanaceae* (Taysum, 1967). Cel comercial este produs de *Hevea brasiliensis,* în condiții în special favorabile pentru dezvoltarea microorganis-

melor : 1) umiditate aproape permanentă între 50 și 100% ; 2) temperaturi cuprinse între 21 și 32°C ; 3) prezența unui număr mare de bacterii în sol ($10^7 - 10^9$/g).

*Latexul pur* este un produs relativ instabil, oxidabil în prezența oxigenului, mai ales la lumină. Este atacat rapid de o serie de bacterii ca : *Gaffkya vernetii, Micrococcus eatonii, M. ridleyi, M. epimethens, Alcaligenes* sp. În aproximativ 6 săptămini, peste 20% din latexul înalt purificat este complet degradat, iar restul profund modificat, decolorat, acidifiat.

*Cauciucul perfect pur* este un amestec de hidrocarburi cu formula $(C_5H_8)_n$.

Latexul de *Hevea* conține 30—40% cauciuc. Dată fiind degradabilitatea lui spontană și mai ales biologică este prelucrat și protejat prin adăugarea de prezervanți chimici (Taysum, 1967).

Microorganismele degradează cauciucul natural, determinînd, în afara pierderii în greutate (~22% în doi ani), modificări ca : gonflarea, slăbirea structurii, pierderea elasticității, transformarea într-o masă sfărîmicioasă sau apariția de perforații etc. Un furtun de grădină lung de 15 m lăsat în apă, la temperatura de 22°C, pierde zilnic, prin oxidare, ~ 1,0 g cauciuc. Într-un an, în condiții optime pentru activitatea microorganismelor și biodegradare poate să piardă pînă la 225 g din regiunea internă.

Între microorganismele active sînt citate, în primul rînd, numeroase bacterii cromogene. Ele determină apariția de pete albe sau colorate (roșii, albastre, negre etc.) pe suprafețele pe care se multiplică. Cele mai frecvent întîlnite sînt următoarele : *Actinomyces fuscus, Micrococcus prodigiosus, A. alba, A. chromogenes, A. longisporus, Proactinomyces* sp., *Micromonospora* sp., *Mycobacterium rubrum, M. lacticola, Pseudomonas fluorescens*, precum și unii microfungi (*Penicillium sp., Aspergillus oryzae* etc.). Aceste microorganisme se pot dezvolta pe medii cu cauciuc ca unică sursă de C și energie. Ele sînt mai active pe cauciucul pur, care este degradat mult mai rapid decît cel comercial prelucrat, prin adăugarea unui număr mare de compuși chimici care îi măresc rezistența la biodegradare și la solvenți, le conferă termorezistență și rezistență mecanică, menținînd elasticitatea, culoarea normală etc.

*Cauciucul sintetic* este produs prin asamblarea unor polimeri sau copolimeri de hidrocarburi nesaturate ca butadien, metilbutadien (izopren), cloropren (clorbutadien), izobutilen, stiren.

Deși diferă mult de cauciucul natural, are unele proprietăți în comun cu acesta, între care și riscul de a fi expus biodeteriorării, în special în condiții de menținere prelungită în mediile umede. În natură, degradarea cauciucului este rezultatul activității comune a unui mare număr de microorganisme asociate și are loc mai rapid și mai intens decît în cazul acțiunii acestora în culturi pure. În condiții naturale, degradarea microbiană a hidrocarburilor din cauciuc poate fi socotită cantitativ neînsemnată în raport cu aceea produsă de căldură, lumină, alcali, acizi sau prin abraziune etc. Ea este, totuși, deosebit de importantă sub raportul consecințelor eventuale în cazul atacării învelișului izolator din cauciuc al cablurilor electrice îngropate în sol sau imerse în apă, procesele microbiene determinînd într-un timp relativ scurt, o scădere considerabilă sau chiar o pierdere a capacității izolante a învelișului, cu toate urmările care pot decurge din aceasta.

## BIODETERIORAREA VOPSELELOR

Este un proces complex ce se realizează atît asupra vopselelor din recipiente (cutii metalice, de material plastic etc.), cît și asupra celor etalate prin procedeele curente de vopsire. Biodeteriorarea vopselelor din diferite ambalaje implică apariția unor fenomene ca : decolorarea, producerea de gaze, modificarea proprietăților fizice și chimice, cu efecte negative asupra posibilității utilizării lor.

Biodeteriorarea vopselelor în peliculă pe lemn sau pe alte substraturi implică apariția fisurilor, a desprinderii de substrat prin formare de vezicule, a caracterului sfărîmicios sau a petelor datorate, în special, hifelor și sporilor fungici (Ross, 1963).

În biodeteriorarea vopselelor au fost incriminate mai multe tipuri de microorganisme :

*Bacterii* : *Alcaligenes* sp., *Bacillus cereus, B. mycoides, Flavobacterium invisibile, F. marinum, Micrococcus albus, M. candidus, M. ureae, Sarcina flava* etc.

Bacteriile cresc de regulă la interfața dintre lemn și vopsea. Unele dintre ele (*F. marinum*) ar proveni chiar din lemn.

*Fungi* : *Alternaria dianthicola, Aspergillus flavus, Cladosporium, Cephalosporium, Fusarium, Helminthosporium, Pullularia pullulans, Phoma glomerata, Paecilomyces* etc.

Prezența fungilor crește capacitatea de retenție a particulelor de praf. Acestea se asociază ferm cu substratul și datorită substanțelor organice contaminante furnizează noi surse de nutrienți pentru fungi.

*Culorile de apă* sînt atacate în special de *Pseudomonas aeruginosa.*

Acțiunea de biodeteriorare a vopselelor are un caracter de gravitate extremă în cazul atacării culorilor operelor de artă (pictură în ulei, frescă etc.).

## ALTERAREA MICROBIANĂ A SUPRAFEȚELOR DE STICLĂ

Deteriorarea suprafețelor de sticlă expuse timp îndelungat agenților atmosferici este cunoscută de mult timp și a fost atribuită multă vreme, în exclusivitate, noxelor fizice și chimice din mediu. În această situație sînt vitraliile vechi de cîteva secole, care au pe suprafața externă o mulțime de găuri, uneori profunde, cu diametrul de cîțiva mm. Observații similare au fost făcute asupra sticlei optice în regiunile tropicale.

Rolul microorganismelor în geneza unor leziuni ale suprafețelor de sticlă a fost demonstrat experimental de Prod'Homme (1965), care a menținut diferite tipuri de sticlă (optică, de vitraliu, de laborator) în medii nutritive lichide, în contact cu numeroase microorganisme (bacterii *Phycomycetes, Ascomycetes, Fungi Imperfecti*). După 5 luni și, în special, după un an a observat o serie de modificări de suprafață și unele leziuni care ar putea sugera prezența unor amprente de colonii bacteriene. „Leziunile" apar, în special, pe suprafețele de sticlă folosită în optică, fiind probabil favorizate de acțiunea de șlefuire mecanică.

Vitraliile sînt ceva mai rezistente, probabil datorită faptului că sînt polizate la foc.

Este probabil că microorganismele se dezvoltă pe suprafața sticlei dacă aceasta este acoperită cu impurități, care conțin substanțe nutritive. Ele produc un efect de mătuire (pierderea luciului și a transparenței), precum și „zgîrieturi" gravate în structura sticlei. Leziunile sînt determinate, probabil, în mare măsură, de acizii organici cu efect coroziv, produși în cursul metabolismului microbian. Leziunile apar mai repede și mai frecvent în regiunile tropicale, și subtropicale și pe suprafețele de sticlă expuse atmosferei umede și impurităților.

Între microorganismele ce pot determina astfel de leziuni sînt citate, în special, o serie de fungi din genurile : *Aspergillus, Penicillium, Scopulariopsis, Alternaria, Cladosporium, Pullularia, Monilia* etc. (Nagamuttu, 1967 ; Eggins și Allsopp, 1975).

## DEGRADAREA ȚESUTURILOR VEGETALE ASOCIATĂ CU TERMOGENEZA MICROBIANĂ

Degajarea de căldură de către microorganisme în cursul activității lor biologice este un fenomen general, variabil sub raport cantitativ și condiționat de utilizarea incompletă a energiei rezultate din oxidarea substanțelor organice în procesul respirației. După datele lui Tauson (1963), coeficientul de folosire de către microorganisme a energiei eliberate în cursul metabolismului depășește rar 40 — 50%, astfel încît restul se pierde în mediu sub formă de căldură.

Acest proces poate fi deosebit de intens în cazul anumitor microorganisme termofile, ceea ce poate produce pagube economice și unele accidente grave, ca acele datorate autoîncălzirii și uneori aprinderii cerealelor depozitate, a clăilor de fîn, a silozurilor sau a combustibililor (turbă și cărbune). Depozitarea cerealelor și a fînului în stare umedă și bine aerată este însoțită de o încălzire rapidă, care poate atinge temperaturi mai mari de 70°C, timp de cîteva zile, după care se răcesc datorită consumării nutrienților ușor accesibili și uscării (fig. 347).

Procesul de încălzire este inițiat de respirația celulelor vegetale, după care sursa principală de căldură devin microorganismele. Inițial, creșterea de temperatură este datorită unor microorganisme saprofite banale, dar cînd temperatura ajunge la 60 — 80°C se crează condiții optime de viață pentru microorganismele termotolerante și termofile.

Lacey (1979) descrie o anumită corelație între conținutul în apă, gradul de încălzire și succesiunea comunităților de microorganisme (fig. 348). Temperatura maximă (65°C) este atinsă la un conținut de apă de 40%.

Microbiota activă este reprezentată de eubacterii (*Bacillus licheniformis*), actinomicete (*Micropolyspora faeni, Thermoactinomyces vulgaris, Streptomyces griseus, S. albus, Saccharomonospora viridis* etc.) și fungi (grupul *Aspergillus glaucus, A. nidulans, A. versicolor, A. fumigatus, Absidia corymbifera, Scopulariopsis brevicaulis, Mucor pusillum, Humicola lanuginosa, Malbranchea pulchella*).

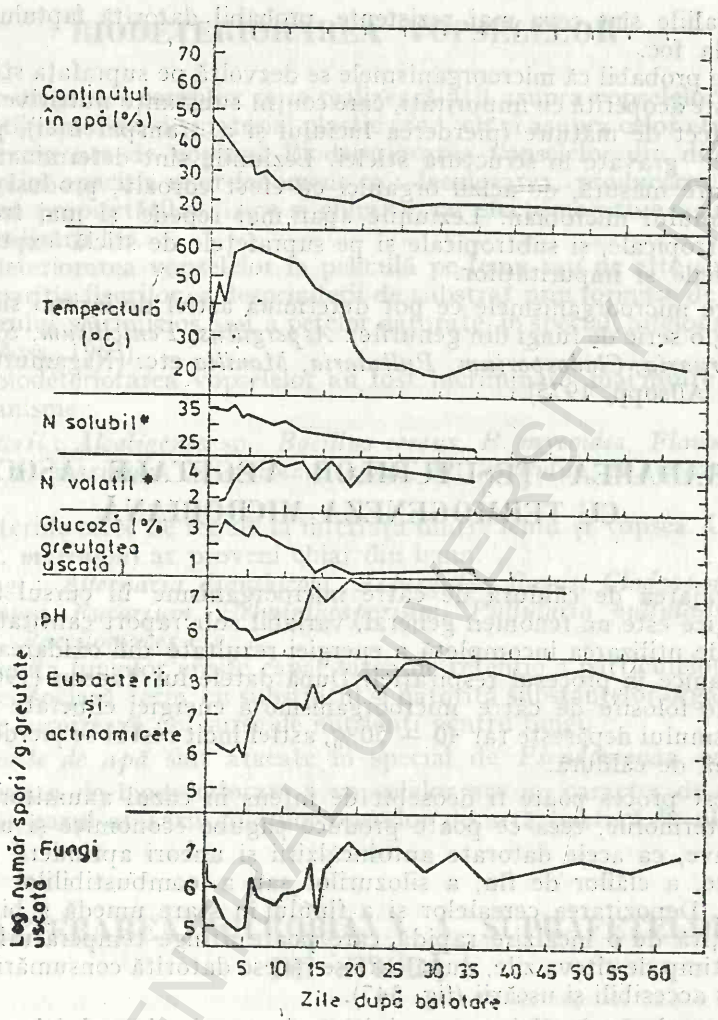



Fig. 347. — Modificările apărute într-un balot de fîn, cu o umiditate de 46%. Azotul solubil și volatil(*) este exprimat ca procentaje din azotul total din fîn (după Lacey, 1979, după datele lui Gregory).

Autoîncălzirea la temperaturi mai mari de 80°C nu mai este determinată de activitatea biologică a microorganismelor, ci rezultă din procese pur chimice de oxidare exotermă, care pot ridica temperatura ambiantă la peste 200°C, producînd unele gaze carburante. Acestea se pot aprinde prin reacții de oxidare catalitică a substanțelor organice în prezența oxigenului liber. Dezvoltarea acestor procese în depozitele de cereale le poate transforma într-o masă carbonizată compactă, care poate fi dislocată numai cu mare dificultate.

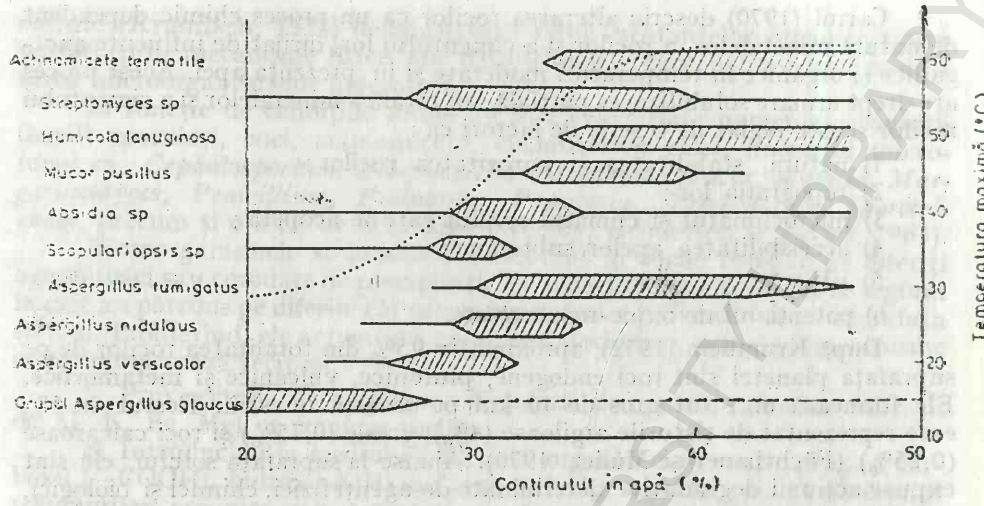



Fig. 348. — Relația dintre colonizarea și succesiunea microorganismelor, ca și dintre conținutul în apă și temperatura fînului încins. Linia punctată indică temperaturile maxime atinse prin activitatea spontană a microorganismelor. Regiunile haşurate indică conținutul în apă la care sporularea este cea mai intensă (după Lacey, 1979).

Fenomene de „autoîncălzire" determinate de activitatea microorganismelor se produc și în depozitele de combustibil, cu cea mai mare frecvență în cazul turbei brichetate. Dacă procesul de autoîncălzire durează mai mult timp (de exemplu, 2—3—5 luni la 70°C), turba se „coxifică", transformîndu-se într-o masă neagră, foarte poroasă și sfărîmicioasă. Datorită proceselor de ardere parțială, se produc, concomitent, diferite produse volatile și carburante, similare celor rezultate din distilarea uscată a lemnului, care se aprind în prezența oxigenului.

Procese de termogeneză microbiană au loc, de asemenea, în gunoiul de grajd, constituit din paie și dejecții (fecale și urină), conținînd un număr imens de microorganisme diferite.

## ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN DEGRADAREA ROCILOR *IN SITU*

**„Bacteriile „mănîneă" rocile, secretînd acizi care disociază elementele minerale și introducînd în mediu acizi organici, capabili să formeze complexe solubile cu diferiți cationi metalici ..."**

J. P. D. VIGNE

Degradarea rocilor *in situ* a fost considerată timp îndelungat ca fiind consecința unor procese mecanice și fizico-chimice, urmate de transportul particulelor de rocă sau al soluțiilor lor.

Carrol (1970) descrie alterarea rocilor ca un proces chimic dependent de natura mineralelor, a rocilor și a cimentului lor, dirijat de influențe anorganice și organice la temperaturi moderate și în prezența apei. Acest proces are drept urmare solubilizarea parțială sau totală a mineralelor și a cimentului rocilor și este reglat de o serie de factori ca :

1) natura, stabilitatea și porozitatea rocilor ;
2) topografia lor ;
3) microclimatul și climatul solului care le acoperă ;
4) accesibilitatea apelor subterane ;
5) pH ;
6) potențialul de oxido-reducere etc.

După Krumbein (1972), aproximativ 95% din totalitatea rocilor de pe suprafața planetei sînt roci endogene, plutonice, vulcanice și metamorfice. Ele formează un strat gros de 10 km pe scoarța terestră. Restul de 5% este reprezentat de șisturile argiloase (4%), gresie (0,75%) și roci calcaroase (0,25%) (Füchtbauer și Müller, 1970). Ajunse la suprafața solului, ele sînt expuse acțiunii degradative determinate de agenți fizici, chimici și biologici, avînd ca rezultat dizolvarea parțială sau completă a mineralelor din structura lor sau a „cimentului" care reunește diferiții constituenți.

Au fost descrise două tipuri de modificări :

1) *Eroziunea* — respectiv fragmentarea în bucăți, rămășițe și particule minerale ;

2) *Coroziunea* — respectiv dizolvarea (hidroliza) elementelor constitutive, avînd drept consecință dispersarea materialului, în parte sub formă de soluție și în parte cu aspectul unor corpusculi în suspensie (Dévigne, 1976).

Transformările rocilor *in situ* se produc și în condiții de sterilitate, însă în prezența microorganismelor au loc mult mai rapid (Berlies și colab., 1964).

Rolul bacteriilor a fost sugerat de către Muntz (1890), care a menționat posibilitatea extinderii activității lor de la suprafață în masa rocilor, iar Gromon (1957) a descris prezența bacteriilor, a microfungilor și a algelor pe suprafața și în fisurile lor. Cu toate acestea, deși rolul agenților fizici și chimici în eroziune a fost mult studiat de geologi și pedologi, cel al organismelor vii a fost timp îndelungat neglijat, deși s-a recunoscut de mult că lichenii, briofitele și chiar plantele superioare au rol degradativ asupra rocilor. Una din dificultățile majore rezidă în complexitatea fenomenelor de degradare a rocilor, care fac practic imposibilă de identificat acțiunea microorganismelor, separat de cea a factorilor fizico-chimici.

Pentru identificarea microorganismelor cu acțiune degradativă, Hueck (1968) recomandă îndeplinirea a trei condiții fundamentale, derivate din postulatele formulate de Koch pentru microorganismele patogene :

1) microorganismele active incriminate să fie prezente constant și în număr mare în leziunile ce li se atribuie ;

2) să poată fi izolate și cultivate în laborator ;

3) să prezinte activitate degradativă similară *in vitro*.

Natura microorganismelor implicate este puțin elucidată. În lucrările mai vechi, acțiunea biodegradativă era considerată ca rezultat al intervenției alternative a unor microorganisme autotrofe și heterotrofe. Datele mai

recente (Krumbein, 1972) demonstrează rolul substanțelor organice transportate prin mecanisme fizice sau fizico-chimice, care pot asigura proliferarea microorganismelor heterotrofe.

În funcție de condițiile locale au fost evidențiate numeroase bacterii (bacili sporulați, coci, actinomicete, cianobacterii etc.), numeroși micromicete ca : *Cephalosporium, Botrytis, Hormodendrum, Mucor, Monilia, Margarinomyces, Penicillium, Pullularia, Papularia, Trichoderma, Sporotrichum*, precum și o serie de microalge (Webley, Henderson și Taylor, 1963).

Microorganismele se localizează frecvent în rocile fisurate de diferiți agenți fizici sau corodate de precipitații, de rădăcinile plantelor sau în regiuni în care au pătruns pe diferite căi substanțe organice provenite de pe suprafața solului. Proliferînd, ele acționează ca agenți biochimici, prin două mecanisme ce se completează reciproc :

1) Prin secreția de acizi care disociază elementele minerale (silicații de Al, K, Fe, Mg) ce compun rocile,

2) Introducînd în mediul-gazdă acizi organici care conțin grupări carboxil (—COOH), hidroxil (OH) sau amino ($NH_2$), rezultați din catabolismul reziduurilor organice sau secretați de microorganisme (Krumbein, 1972; Dévigne, 1976). Aceștia favorizează sechestrarea cationilor polivalenți ($Al^{3+}$, $Fe^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$) sub formă de complexe organometalice solubile.

Stadiul final al degradării este reprezentat de apariția unor compuși ca : $SiO_2$, $Al_2O_3$, $TiO_2$, FeO sau $Fe_2O_3$, $K_2O$, $Na_2O$, MgO, CaO (argile), sau soluțiile lor. Aceste stadii finale nu sînt atinse totdeauna. De cele mai multe ori, procesele degradative se rezumă la distrugerea parțială a texturii și a edificiului structural al rocilor, deși nu este exclusă ruperea unor molecule definitorii (tetraedre de $SiO_4$, $AlO_4$ etc.).

În cazurile în care procesele au o intensitate suficient de marcată, mineralele incomplet dizolvate sau transformate sînt transportate și sedimentate pentru a forma roci sedimentare cu compoziție diferită de rocile originare (Krumbein, 1972).

În general, activitatea microorganismelor mărește viteza proceselor de degradare comparativ cu cea a proceselor fizico-chimice. Astfel, acizii proveniți din catabolismul diferitelor resturi organice solubilizează de 50 de ori mai mult siliciu și de 1000 de ori mai mult aluminiu decît apa de ploaie. În mod asemănător, acizii secretați de microorganisme solubilizează de cinci ori mai mult $SiO_2$ și de zece ori mai mult Al decît apa de precipitații.

Efectul de stimulare a proceselor degradative este demonstrat și de faptul că *Thiobacillus* sp. oxidează 200 ppm de Fe feros ($Fe^{2+}$) la fier feric ($Fe^{3+}$) în trei zile. În aceleași condiții fizico-chimice naturale, oxidarea prin reacții pur chimice durează doi ani.

Procesele de degradare microbiană a rocilor nu au o evoluție lineară. În funcție de condiții, ele pot fi dominate de cele fizico-chimice sau le pot domina pe acestea (Krumbein, 1972). Există situații în care ele se pot opri, pentru a fi reluate atunci cînd condițiile de climă, mediul biologic sau compoziția rocii se modifică.

O particularitate a proceselor biodegradative este că nu necesită obligatoriu contactul direct cu roca. Ele pot fi realizate și la distanță deoarece, spre exemplu, apele interstițiale modificate de produșii metabolismului microorganismelor se scurg în sol și de-a lungul fisurilor rocilor, putînd ajunge în adîncime în contact cu rocile subiacente. În felul acesta, acizii organici,

compușii complexanți prezenți în soluție etc. influențează transportul, fixarea biologică, resolubilizarea, transportul final și precipitarea mineralelor în alte zone (Krumbein, 1972; Bertrand, 1972), mai îndepărtate de locul inițial de acțiune.

### Degradarea rocilor plutonice, vulcanice și metamorfice

Studiată în special asupra rocilor folosite ca material de construcție și în mai mică măsură asupra celor *in situ*, degradarea acestui tip de roci se supune aceleiași reguli generale: prezența microorganismelor autotrofe sau heterotrofe accelerează viteza de degradare și de solubilizare a constituenților lor.

Silverman și Munoz (1970) au demonstrat influența microfungilor asupra degradării mai multor tipuri de roci pe bază de silicat (granit, bazalt, dunit, peridotit, andezit, gradiolit), în cursul căreia solubilizează pînă la 31% Si, 11% Al, 64% Fe și 59% Mg. Produsul metabolic cel mai activ în acest proces este acidul citric. În alte cazuri, produsul activ este acidul oxalic sau 2-cetogluconic.

Deși datele publicate sînt relativ sumare, se poate afirma că microorganismele joacă un rol important în degradarea rocilor ce conțin silicați încorporînd activ diferite elemente nutritive și producînd mai mulți acizi organici și substanțe complexante. Rocile pe bază de silicați conțin o cantitate importantă de fosfați puțin solubili și, ca atare, inaccesibili plantelor. De aceea, pe plan global, degradarea rocilor sub acțiunea microorganismelor are o importanță majoră pentru viața plantelor, deoarece este asociată cu eliberarea a diferiți compuși cu rol esențial în nutriția acestora.

### Alterarea rocilor sedimentare

Distrugerea feldspatului și a micelor demonstrează că în cazul gresiei, microbiota specializată poate solubiliza nu numai cimentul rocilor sedimentare, ci și o parte din constituenții lor minerali (Krumbein, 1966, 1972).

Fenomenele de degradare microbiană a rocilor calcaroase și a gresiei cu ciment carbonatat, deși au fost studiate cel mai adesea asupra pietrelor de construcție, pot fi extrapolate și asupra rocilor *in situ*. Eroziunea rocilor calcare de coastă, din zonele litorală și supralitorală studiată de Kornmann (1970), este determinată de intervenția cianobacteriilor, a unei alge roșii și a două alge verzi perforante din genul *Gomontia*. Microfungii, fie separat, fie în asociere simbiotică cu unele alge endolitice, degradează activ rocile calcare, în special pe cele cu ciment carbonatat. Cînd sînt lipsiți de nutrienți, microfungii produc, probabil ca răspuns la condițiile de mediul cantități importante de acizi. Atît fungii neperforanți, cît și multe bacterii pot pătrunde prin fisuri și pori, între 0,5 și peste 2 cm, contribuind, în felul acesta, la degradarea activă a rocilor sedimentare.

Comentînd rezultatele lui Jaton (1971), care a evidențiat prezența a $\sim 10^7$ bacterii heterotrofe/g de rocă, Krumbein (1972) consideră că, pînă în prezent, s-a subestimat conținutul în substanțe organice al rocilor sedimentare. Date mai recente demonstrează că, în anumite condiții, ele pot asigura multiplicarea și metabolismul activ al multor bacterii heterotrofe.

Între produșii metabolici cu activitate solubilizantă cei mai activi sînt: acizii formic, acetic, propionic, butiric, citric, gluconic, 2-cetogluconic, uro-

nici, poliuronici, acizii specifici produși de licheni și, în oarecare măsură, acizii humici. Ei pot accelera solubilizarea fizico-chimică prin formarea de complexe solubile.

*Alterarea rocilor de către microorganismele chimiolitotrofe* se realizează prin intermediul acizilor produși, activi atît asupra rocilor *in situ*, cît și a celor din construcții.

*Thiobacillus ferrooxidans*, prezent în apele acide de mine, atacă rocile calcare și pe cele cu ciment carbonatat. O particularitate comună a atacului exercitat de aceste bacterii este producerea de $SO_4^{2-}$ și secundar transformarea carbonatului de calciu în sulfat de calciu (gips), asociată cu solubilizarea acestuia de apele care pătrund în rocă.

*Thiobacillus* sp. degradează materialele de construcții în special în climatul temperat umed. Originea sulfului redus necesar acestui proces este diferită în funcție de topografia alterării. În regiunile inferioare ale zidurilor din piatră ar proveni din sol, apa urcînd prin capilaritate pînă la o anumită înălțime, unde fenomenul se localizează.

La fundația zidurilor au fost evidențiate bacterii ca *Sporovibrio desulfuricans*, care reduc sulfații din sol. Pe o profunzime de cîțiva mm sau cm, piatra se dezagregă, devenind pulverulentă, datorită cantității mari de gips ($SO_4Ca$). În aglomerările urbane se adaugă acțiunea negativă a acidului sulfuric din atmosferă, generat de arderea combustibililor fosili, a gazelor automobilelor, gazelor eliminate de industrie etc..

Grupul *Nitrosomonas—Nitrobacter* acționează prin intermediul nitraților de Na, K, Ca și Mg, care au o acțiune distructivă, în special prin modificarea de volum asociată cu tranziția de la starea uscată la cea umedă. În cazul rocilor în curs de degradare există o corelație directă între numărul bacteriilor care oxidează $NH_3$ și $NO_2^-$ și cantitatea de nitrat prezentă în interiorul lor.

În sfîrșit, *Desulfovibrio* sp, influențează alterarea rocilor prin solubilizarea metalelor în condiții de anaerobioză. Degradarea rocilor sub influența microorganismelor are o importanță deosebită, în special, în cazul celor folosite în construcții și al celor incorporate în opere de artă.

## COROZIUNEA BACTERIANĂ A METALELOR

Coroziunea metalelor este rezultatul unui proces complex, determinat de mecanisme multiple, interdependente: chimice, mecanice, electrice și biologice. Datorită lor, fierul, oțelul, fonta și alte metale menținute într-un mediu umed suferă procese de coroziune, prin care un metal trece de la condiția elementară la o stare de combinație chimică (Iverson, 1968). Una din formele cele mai atenuate ale acestui proces chimic este *patina* (oxidarea naturală sau artificială), evidentă în cazul bronzului, care se acoperă cu un strat de carbonat de cupru, de culoare verzuie.

Coroziunea bacteriană este frecventă la conductele de apă potabilă și reziduală, de gaze și de petrol, ca și la cele care deservesc instalațiile sanitare. Ea începe prin apariția unor pete de rugină cu contur neregulat, adînci de 1 — 6 mm, în locul cărora se produc, ulterior, pierderi de substanțe. În unele cazuri, coroziunea se poate extinde în suprafață și în profunzime pe zone mai mari, determinînd perforarea conductelor, scurgeri de petrol în

jurul lor și diferite fenomene negative asociate (explozii în apropierea conductelor de gaze sau pătrunderea unor microorganisme patogene prin aspirație din sol, în cazul conductelor de apă potabilă). Conductele de fontă suferă un proces de *grafitizare*, în care metalul este corodat cu formare de sulfură feroasă și hidroxid feros. Ele își păstrează aspectul obișnuit, din cauza grafitului prezent în fontă, dar capătă o consistență atît de moale încît pot fi tăiate cu cuțitul.

Microorganismele sînt implicate în mai multe tipuri de modificări ale metalelor, incluzînd : coroziunea anaerobă, prin depolarizare catodică, producerea de compuși de metabolism corozivi, producerea de fenomene de aerare diferențială și concentrarea de celule pe suprafața acestora, degradarea peliculelor protectoare naturale sau aplicate artificial, degradarea inhibitorilor coroziunii etc. (Booth, 1971).

Ideea participării bacteriilor în coroziune a fost sugerată, încă din anul 1891, de Garrett.

### Coroziunea bacteriană anaerobă

Are o importanță majoră pentru instalațiile de forare și exploatare a sondelor. Mecanismul coroziunii nu este unanim acceptat, dar *a priori* s-a acordat o atenție deosebită bacteriilor sulfat-reducătoare, izolate frecvent de la adîncimi de peste 1000 m, unde sînt bine adaptate și se pot dezvolta în formațiunile purtătoare de țiței. Davis și Updegraff (1954) consideră că ar fi autohtone, în timp ce alți cercetători cred că sînt introduse în cursul operațiunilor de forare din regiunile supraiacente.

**Teoria depolarizării catodice** a fost formulată de Kühr și van der Veugt (1934). Această teorie explică fenomenele de coroziune ale fierului și oțelului menținute perioade îndelungate în solul umed sau în contact cu ape bogat poluate în substanțe organice. Coroziunea este asociată cu modificări localizate, caracterizate prin apariția unui produs de culoare neagră, atașat lax de metal (grafitizare). După îndepărtarea lui, rămîne vizibil metalul lucitor.

Teoria se bazează pe ideea că în medii umede, suprafața fierului prezintă numeroase sisteme electrochimice, ale căror elemente catodice — în condiții neutre și în absența oxigenului — sînt polarizate de hidrogen.

În acest proces, bacteriile sulfat-reducătoare (*Desulfovibrio vulgaris, D. desulfuricans, D. aestuarii, D. rubentschickii, D. salexigenes, Desulfotomaculum* sp.), care au în echipamentul lor enzimatic un sistem de hidrogenaze, pot folosi hidrogenul molecular catodic. Ele acționează în reacția normală de depolarizare ca un substituent al oxigenului, oxidînd hidrogenul catodic și permițînd desfășurarea procesului de coroziune. Produșii de coroziune rezultați sînt FeS și $Fe(OH)_2$, după reacțiile :

(1) $4\,Fe \rightarrow 4\,Fe^{2+} + 8\,e$ (soluție anodică)

(2) $8\,H_2O \rightarrow 8\,H^+ + 8(OH)^-$

(3) $8\,H^+ + 8\,e \rightarrow 8\,H$ (reacție catodică)

(4) $H_2SO_4 + 8H \rightarrow H_2S + 4\,H_2O$ (depolarizare catodică, prin oxidarea H de către bacteriile sulfatreducătoare)

(5) $Fe^{2+} + H_2S \rightarrow FeS$ (produs de coroziune)

(6) $3\ Fe^{2+} + 6(OH)^- \rightarrow 3\ Fe(OH)_2$ (produs de coroziune)

Reacția globală: $4\ Fe + H_2SO_4 + 4\ H_2O \rightarrow FeS + 3\ Fe(OH)_2 + 2(OH)^- + H_2$

Etapa critică a teoriei coroziunii catodice este reprezentată de reacția a patra, prin care hidrogenul acumulat pe suprafața metalului este utilizat de bacteriile sulfat-reducătoare pentru reducerea sulfatului (Booth, 1971). (fig. 349).

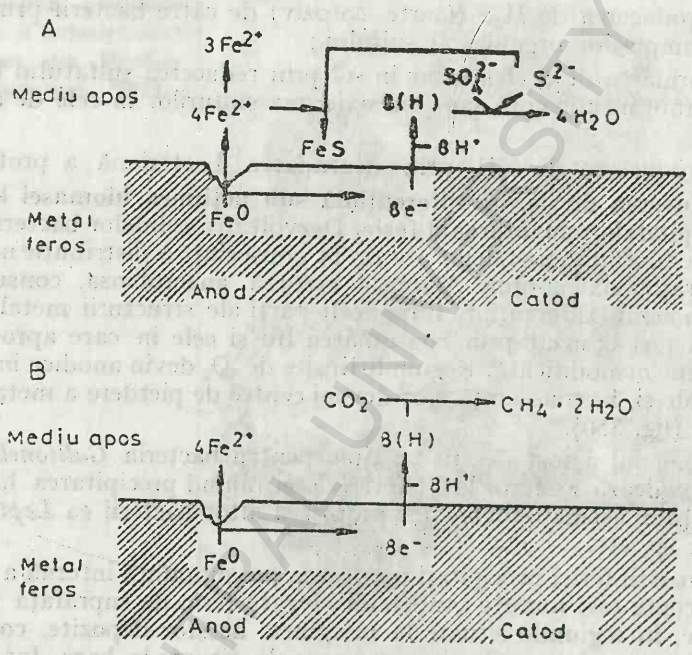



Fig. 349. — Reprezentarea schematică a reacțiilor de depolarizare catodică ce participă în coroziunea metalelor feroase sub acțiunea bacteriilor sulfat-reducătoare (A) după mecanismul propus de von Wolzogen, Kühr și van der Veugt. B. Depolarizarea catodică sub acțiunea bacteriilor metanogene (după Daniels și colab., 1987).

Lucrînd cu diferite specii de bacterii sulfat-reducătoare, Booth și Tiller (1962) au demonstrat că aptitudinea lor de a produce depolarizare catodică depinde de posedarea unui sistem enzimatic cu activitate hidrogenazică. Astfel, *Desulfovibrio vulgaris*, care are hidrogenaze, produce o depolarizare catodică marcată prin reducerea sulfatului cu H, în timp ce *D. orientis*, lipsit de hidrogenaze, nu poate realiza acest proces. Prin acest mecanism, microorganismele intră direct într-o serie de reacții electrochimice la suprafața substratului metalic, fie pentru a iniția, fie pentru a accelera o reacție potențial prezentă dinainte. În urma acestor procese, pe conductele de apă sau de gaze, în canale etc., modificările apar pe suprafața externă unde condițiile de dezvoltare a microorganismelor sînt considerate ca optime. În bazinele de păstrare a țițeiului, coroziunea este mai frecventă pe fața internă și,

în special, în regiunile de fund, unde se produc acumulări de substanțe organice care asigură nutrienții necesari pentru dezvoltarea microorganismelor. În instalațiile de exploatare a țițeiului au fost evidențiate găuri mari la adîncimi cuprinse între 300 și 2 500 m. O conductă de oțel groasă de ~ 1 cm poate fi corodată în circa patru ani.

Fenomenele de coroziune pot fi produse și pe căi alternative ca, de exemplu, prin :

1) producerea de acizi organici de către *Lactobacillus* sp. în fabricile de zahăr ;

2) producerea de $H_2S$ (foarte coroziv) de către bacterii prin descompunerea compușilor organici ai sulfului ;

3) formarea de S elementar în sol prin reducerea sulfatului în perioadele de aerare insuficientă sau prin oxidarea sulfurilor în cele de aerare intensă ;

4) producerea de $NH_3$ prin degradarea bacteriană a proteinelor.

**Producerea de aerare diferențială sub acțiunea biomasei bacteriene și a precipitatelor de hidroxid feric.** Dezvoltarea celulelor bacteriene strîns aderente de suprafața metalelor are drept consecință o distribuție neuniformă a concentrației oxigenului. Aerobele creează anaerobioza, consumînd $O_2$, și produc o aerare diferențiată între acele părți ale structurii metalice în care oxigenul a fost epuizat prin consumarea lui și cele în care aprovizionarea cu $O_2$ rămîne nemodificată. Regiunile lipsite de $O_2$ devin anodice în raport cu cele normale și, în consecință, vor deveni centre de pierdere a metalului prin coroziune, (fig. 350).

Fenomenul a fost descris ca tipic pentru bacteria *Gallionella ferruginea*, care oxidează Fe feros la Fe feric, determinînd precipitarea hidroxizilor ferici. Acțiuni asemănătoare sînt proprii și altor bacterii ca *Leptothrix* sp., *Crenothrix* sp. etc.

Hidroxizii ferici precipitați pot forma pe suprafața internă a conductelor excrescențe tari numite „tuberculi" legate ferm de suprafața metalului. Ca urmare, în regiunile situate la marginea acestor depozite, concentrația oxigenului este mai mare, în timp ce în zonele situate la baza lor, suprafața conductei este protejată de contactul cu $O_2$ dizolvat în apă.

În consecință, suprafața conductei acoperită de tuberculi devine anodică în raport cu regiunile suprafeței interne a conductei neacoperite de depozitele de bacterii și precipitate de fier, care sînt catodice. Zonele anodice devin sediul unor puncte de corodare localizată, deosebit de intensă, care perforează conductele. Un fenomen agravant este reprezentat de faptul că în zona bazală anaerobă a „tuberculilor" se dezvoltă frecvent bacterii sulfat-reducătoare care proliferează și adaugă propriul lor efect de coroziune. Cînd tuberculul este îndepărtat, suprafața lui de contact cu metalul este bogată în sulfuri (Tomashov și Mikhailovsky, 1959 ; Booth, 1971).

Un fenomen similar în care bacteriile sulfat-reducătoare beneficiază de anaerobioza creată prin creșterea microorganismelor aerobe a fost descris de Iverson (1967). El este întîlnit în cazul coroziunii tancurilor din aluminiu pentru combustibilul aeronavelor. Coroziunea este determinată de asocierea bacteriilor sulfat-reducătoare cu *Pseudomonas aeruginosa* și cu o specie de fungi *Cladosporium resinae*.

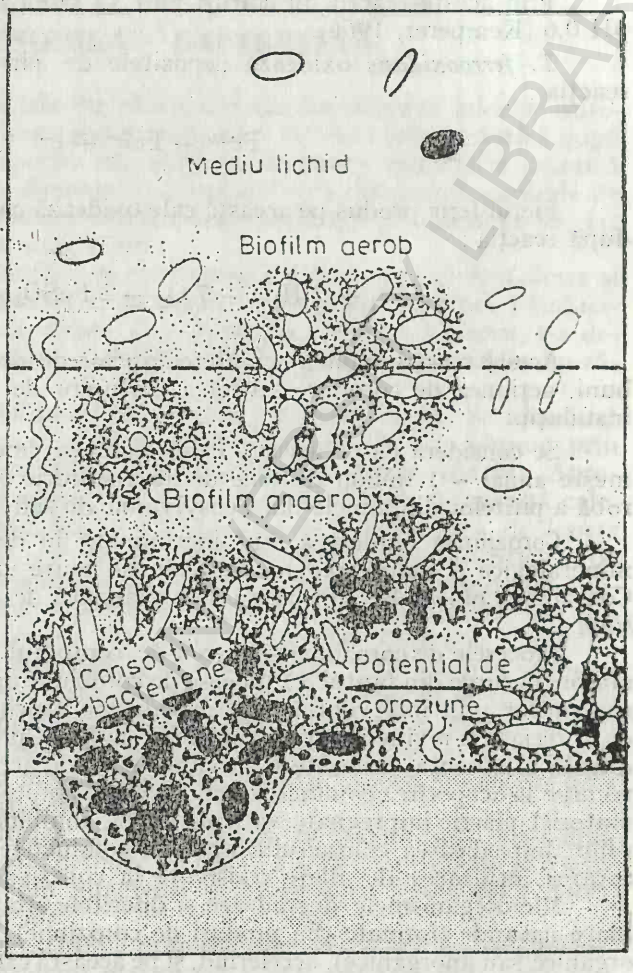



Fig. 350. — Reprezentarea schematică a modului de formare a regiunilor aerobe și anaerobe în structura unui biofilm matur pe suprafața metalelor. Consorțiile de bacterii anaerobe și microcoloniile adiacente realizează un potențial de coroziune care grăbește apariția produșilor de coroziune și formarea unor leziuni adînci (din Blenkinsopp și Costerton, 1991).

**Coroziunea oxidativă** (coroziunea „acidă")

Coroziunea oxidativă are ca substrat producerea de metaboliți corozivi (acizi minerali sau organici), respectiv a unui exces de $H^+$ și se realizează în condiții naturale cel mai adesea prin acțiunea asociată a bacteriilor *Thiobacillus* sp. și *Thiobacillus* (*Ferrobacillus*) *ferrooxidans*.

Primele obțin energia din oxidarea S°, a tiosulfaților și a politionaților, cu producerea de $SO_4H_2$ după reacțiile :

*T. thiooxidans* : $2\,S^\circ + 3\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,H_2SO_4$

*T. thioparus* : $Na_2S_2O_3 + 2\,O_2 + H_2O \rightarrow Na_2SO_4 + H_2SO_4$

*T. thioparus* : $2Na_2S_4O_6 + 7\,O_2 + 6\,H_2O \rightarrow 2\,Na_2SO_4 + 6\,H_2SO_4$

Prin aceste reacții, în culturi pure *in vitro* au fost obținute valori de pH 0,6 (Kemperer, 1966).

*T. ferrooxidans* oxidează depozitele de pirită, obținînd energie din reacția :

$$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-$$

Fierul feric produs pe această cale oxidează compușii sulfului la $H_2SO_4$ după reacția :

$$2\,FeS_2 + 2\,H_2O + 7\,O_2 \rightarrow 2\,FeSO_4 + 2\,H_2SO_4$$

Aceste reacții explică acidifierea apelor de drenare din minele de cărbuni, acțiunea de corodare severă a mașinilor de pompare și a diferitelor instalații.

Se consideră că pe această cale, regiunea de drenare în rîul Ohio primește anual ~ 1 milion de tone de acid sulfuric rezultat din oxidarea aerobă a piritelor din minele din Pensylvania de sud (Booth, 1971).

Coroziunea oxidativă este incriminată în degradarea unor exponate mineralogice și palcontologice muzeale de mare valoare („Fossil disease"). Coroziunea obiectelor din cupru este realizată de *Flavobacterium hydrophilium*.

Procesele de coroziune sînt greu de combătut. Unul din impedimentele majore decurge din faptul că procese de coroziune apar și în absența microorganismelor prin intervenția unor mecanisme fizico-chimice. Este încă greu de apreciat cît revine microorganismelor în acest proces. Combaterea lui este dificilă în absența cunoașterii mecanismelor de acțiune. În mod obișnuit se recurge la acoperirea conductelor cu învelișuri protectoare care conțin bitum, material plastic impregnat, vată de sticlă, inhibitori de dezvoltare a bacteriilor, împiedicarea contactului apei cu conductele cu ajutorul izolatorilor, aerarea, utilizarea de aliaje rezistente la coroziune.

Microorganismele degradează și diferitele straturi de învelișuri protectoare naturale (formate din produși de coroziune) sau artificiale (învelișuri organice sau anorganice), accelerînd, și pe această cale, procesele de degradare care produc pagube economice enorme.

**Blocarea bacteriană a conductelor de apă.** În afară de coroziunea metalului, conductele de apă pot suferi fenomenul de „blocare" a tranzitului, din cauza dezvoltării excesive a unor bacterii filamentoase ca, de exemplu, *Crenothrix polyspora*, care se fixează cu o extremitate a filamentului de peretele intern al conductei. Blocarea mai mult sau mai puțin completă este produsă de biomasa bacteriilor acumulate și de cantitatea mare de hidroxid de fier ($Fe_2(OH)_6$) pe care îl produc în urma activității lor metabolice.

Bioblocarea conductelor este favorizată de prezența unei surse de fier (frecvent furnizată chiar de apa din conductă), a substanțelor organice și a $CO_2$ dizolvat. Apa din conductele respective capătă o turbiditate roșiatică, miros și gust neplăcut.

Multiplicarea bacteriilor capabile să producă bioblocarea conductelor este împiedicată prin clorinarea apei, iar în cazurile extreme prin căptușirea conductei cu un strat de ciment sau de bitum.

## BIOSOLUBILIZAREA METALELOR „LEȘIEREA" BACTERIANĂ

Recuperarea unor metale din zăcăminte sau din efluenții minelor antedatează cu mult descoperirea rolului bacteriilor în acest proces. Astfel, după date certe, recuperarea cuprului din apele de drenare a minelor se practică încă din anul 1000 î. e. n. Romanii extrăgeau Cu din situsurile naturale de leșiere. În Germania se practică leșierea industrială din secolul al 16-lea, iar în Spania (Rio Tinto) din anul 1750.

Rolul posibil al bacteriilor în acest proces a fost sugerat de Colmer și Hinkle (1947), care au descoperit prezența constantă a bacteriei *Thiobacillus ferrooxidans* în apele de drenaj ale minelor de cărbune. Ulterior, s-a demonstrat că aceasta, în asociere cu *T. thiooxidans* „dizolvă" metalele din zăcăminte.

În prezent, biosolubilizarea se practică pe scară largă. Se apreciază că la nivelul anului 1982, aproximativ 280 000 tone de Cu s-au obținut prin leșierea pe haldele de minereu sărac și peste 50 000 de tone în subteran. Aproximativ 11,5% din cuprul utilizat în S. U. A. este obținut pe această cale.

Procedeele de biosolubilizare sînt reunite sub denumirea de *leșiere* (engl. „Leaching" = de la „to leach" = a extrage; fr. „lixiviation" de la l. „lixivium"=leșie). Termenul caracterizează ansamblul procedeelor tehnice și tehnologice, care duc la eliberarea metalelor din zăcăminte sau din depozitele de steril. Ele includ: sfărîmarea minereului, extracția și selecția unei anumite categorii de minerale și de concentrate, solubilizarea propriu-zisă realizată de către bacterii sau metaboliții lor și extracția metalelor din soluție. În acest cadru, microorganismele sînt utilizate nu numai pentru oxidarea mineralelor sulfuroase din minereuri și concentrate, ci și ca agenți de flotație pentru tratarea mineralelor sau pentru extracția și concentrarea metalelor din soluție (Karavaiko, 1982).

Procedeele se încadrează în preocupările cunoscute sub denumirea de *hidrometalurgie microbiană*, definite de Brierley și Brierley (1986) ca legate de solubilizarea metalelor din minereuri și recuperarea elementelor dorite cu ajutorul microorganismelor.

Mai recent, Beveridge (1989) propune denumirea de *microbiogeochimic*, termen descriptiv considerat mai corect și mai adecvat unui cadru mai larg pentru o serie de preocupări care conferă o nouă dimensiune microbiologiei.

### MICROORGANISMELE ACTIVE ÎN BIOSOLUBILIZARE

Sistemele de leșiere a metalelor sînt complexe și includ un număr important de microorganisme, în special chemolitotrofe, avînd habitatul natural în mediile respective și o activitate intensă la un pH scăzut.

Au fost implicate, pînă în prezent, *Thiobacilus ferrooxidans* (cel mai mult studiat), *T. thiooxidans*, *T. organoparus*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *S. brierleyi*, *Sulfobacillus thermosulfooxidans*, *Thermothrix thioparus* etc. Ele au fost studiate mai mult individual, astfel încît interacțiunile dintre ele, importante pentru ecologia sistemului, nu sînt cunoscute.

**T. ferrooxidans**, cu rol fundamental în procesele de biosolubilizare, a fost izolat curent din apele acide ale minelor de cărbune. Au fost izolate și tulpini ușor termofile. Are rolul de a converti Fe feros ($Fe^{2+}$) la Fe feric ($Fe^{3+}$). În plus, poate transforma compușii sulfului, prezenți în diferite grade de oxidare. Astfel, poate folosi sulfurile solubile și insolubile (care conțin $S^{2-}$), sulful nativ ($S^{\circ}$), precum și compușii care conțin ionii tiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) sau tetrationat ($S_4O_6^{2-}$). În toate aceste cazuri, produsul transformării este o substanță în care atomul de S are mai puțini electroni de valență.

Reacțiile de oxidare ale $Fe^{2+}$ și ale $S^{\circ}$ se pot realiza și spontan (fără intervenția bacteriilor), respectiv sub acțiunea oxigenului în aer. Procesul astfel realizat, la temperaturi de 5 — 20°C și presiuni normale, este foarte puțin activ și fără interes pentru practică. Prezența bacteriei *T. ferrooxidans* accelerează reacția de 200 000 — 500 000 de ori.

Au fost evidențiate tulpini și specii de *Thiobacillus* active în condiții de pH neutru. Ele ar acționa în fazele inițiale ale procesului de biosolubilizare avînd rolul de a mări aciditatea mediului și de a deschide calea multiplicării bacteriilor acidofile.

Asocierea *T. ferrooxidans — T. thiooxidans* este, în mod evident, mai activă decît acțiunea separată a celor două specii. De asemenea, s-a demonstrat că împreună *T. organoparus* și *Leptospirillum ferrooxidans* degradează pirita ($FeS_2$) și calcopirita ($CuFeS_2$), în timp ce fiecare în parte sînt inactive.

**Sulfolobus acidocaldarius** și **S. brierleyi** (*Archaebacteria*) sînt prezente în izvoarele termale, frecvent atașate de particulele de sulf elementar prin intermediul unor fimbrii inegale (Weiss, 1973). Gradul de legare este corelat cu numărul și cu lungimea fimbriilor. Experimental s-a demonstrat că după 17 zile de contact, cristalele de $S^{\circ}$ sînt complet acoperite cu bacterii. Paralel crește și gradul de oxidare a $S^{\circ}$, deși legarea nu este o precondiție obligatorie.

Aceste bacterii obțin energie din oxidarea S și Fe, iar carbonul din $CO_2$ sau compușii organici simpli acționează și în condiții extreme de temperatură și pH.

**Sulfolobus sp.** atacă ușor mineralele cele mai rezistente față de alte bacterii (așa cum sînt calcopirita și molibdenitul ($MoS_2$)), dacă produșii respectivi nu sînt toxici pentru microorganisme.

**Thermothrix thioparus** este o bacterie filamentoasă care proliferează pe pirită. A fost evidențiată în surse de ape termale cu un pH apropiat de neutralitate. Este activă la 60—75°C. Oxidează ionii de sulfhidril ($HS^-$), sulfit ($SO_3^{2-}$), tiosulfat ($S_2O_3^{2-}$), precum și $S^{\circ}$ în aerobioză, pentru a forma ioni de sulfat ($SO_4^{2-}$), dar și în anaerobioză (în prezența nitratului).

*T. thioparus* nu are o funcție specifică în extracția metalelor. Este probabil că datorită capacității de a coloniza mineralele cu sulf ar acționa indirect, producînd $H_2SO_4$, creînd un mediu favorabil pentru bacteriile termofile acidofile implicate direct în lesiere.

### Interacțiuni microorganisme — substrat

Încercările de cuantificare a prezenței microorganismelor active în biosolubilizare sînt dificile, datorită aderării lor ferme de diferite substrate sau capturării în precipitatele de Fe feric (Brierley și Brierley, 1973). Desorbția este foarte greu de realizat.

Mecanismul și semnificația adeziunii nu sînt cunoscute. Unii cercetători consideră adeziunea ca bazată pe mecanisme chimice, alții pe prezența anumitor structuri de tip „crampon", care nu au fost însă evidențiate morfologic, cel puțin la *T. thiooxidans*. Un rol important ar putea reveni fimbriilor, care, și în alte cazuri, acționează ca organite de adeziune.

La fel de greu de explicat este legarea preferențială a bacteriilor de anumite regiuni ale unui minereu, respectiv de zone care conțin Fe și S redus, care pot fi folosite ca substrat energetic. Deși s-a demonstrat că legarea bacteriilor de S° nu este esențială pentru oxidarea acestuia, este cert că interacțiunea bacterii/particule mărește gradul de oxidare. Unele date ca, de exemplu, evidențierea unor fenomene de „eroziune" a cristalelor de S° în vecinătatea locului de legare a bacteriilor pledează pentru o implicare directă a acestora în atacul rețelei minerale. Unele date pledează chiar pentru sinteza *de novo* a unor substanțe organice la situsul de legare.

## MECANISMELE BIOSOLUBILIZĂRII

Solubilizarea sau leșierea metalelor din zăcăminte a fost considerată mult timp ca rezultat al unor reacții pur chimice, desfășurate în prezența apei și a oxigenului atmosferic. Descoperirea bacteriilor Fe-oxidante active în mediu acid a determinat reconsiderarea acestui proces, în primul rînd de natură biologică.

S-a demonstrat că bacteriile pot acționa pe două căi : 1) *direct*, respectiv oxidînd mineralele sulfurate prin acțiune nemediată și 2) *indirect*, participînd la oxidare prin producerea de $Fe^{3+}$ și $H_2SO_4$. Cinetica oxidării bacteriochimice a diferitelor metale sulfurate depinde de proprietățile lor termodinamice, de caracteristicile interacțiunii lor în minerale, de condițiile de mediu (pH, temperatură, $O_2$, $CO_2$), precum și de tehnologia de leșiere. În acest proces, bacteriile acționează ca principali agenți ai intensificării proceselor de oxidare, intervenind activ în solubilizarea metalelor din minereuri și concentrate la presiuni și temperaturi normale.

### Biosolubilizarea indirectă

Este procedeul prin care metalele sînt eliberate din mineralele insolubile prin intermediul oxidanților chimici produși de microorganisme.

Sistemul cel mai mult studiat, putînd fi considerat ca model, este cel referitor la pirită ($FeS_2$), care are avantajul de a fi frecvent întîlnit și ușor oxidabil.

Reacțiile oxidative caracteristice leșierii indirecte se pot produce, deci, și ca oxidări pur chimice. Prezența și activitatea microorganismelor accelerează însă mult viteza reacțiilor chimice. În condiții naturale, cele două tipuri de procese, chimic și biologic, constituie un sistem complex a cărui funcționare concomitentă depinde de factori fizici, hidrologici, geologici și industriali.

În leșierea indirectă, bacteriile produc Fe feric ($Fe^{3+}$) ca $Fe_2(SO_4)_3$ prin oxidarea Fe feros ($Fe^{2+}$) solubil. Cum $Fe_2(SO_4)_3$ este un oxidant puternic, el poate dizolva o mare varietate de metale pe care le transformă în ioni oxidanți solubili într-o soluție de acid sulfuric. Leșierea produsă sub acțiunea sulfatului feric $Fe_2(SO_4)_3$ este numită indirectă deoarece are loc

în absența bacteriilor viabile, ca și în absența $O_2$. În cursul acestei reacții reapare Fe feros care este rapid reoxidat de bacterii. Aceasta explică denumirea de lesiere „asistată" dată lesierii indirecte.

În acest proces, intervenția bacteriei *T. ferrooxidans* mărește viteza reacției de oxidare de peste un milion de ori (Brierley, 1982). Reacțiile produse în cazul participării bacteriei *T. ferrooxidans* și al oxidării chimice al piritei ($FeS_2$) sînt următoarele:

$$2\,FeS_2 + 7\,O_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{bacterii}} 2\,FeSO_4 + 2\,H_2SO_4$$

$$FeS_2 + Fe_2(SO_4)_3 \xrightarrow{\text{r. chimică}} 3\,FeSO_4 + 2\,S^\circ$$

$$4\,FeSO_4 + O_2 + 2\,H_2SO_4 \xrightarrow{\text{bacterii}} 2\,Fe_2(SO_4)_3 + 2\,H_2O$$

$$2\,S^\circ + 3\,O_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{r. chimică}} 2\,H_2SO_4$$

---

Reacția globală: $4\,FeS_2 + 15\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,Fe_2(SO_4)_3 + 2\,H_2SO_4$

Este probabil că atomii de Fe și cei de S din pirite sînt oxidați simultan, dar numai după ce sulfurile sînt disociate din rețeaua cristalină a mineralelor (Lundgren, Valkova-Valchanova și Reed, 1986).

Tehnica indirectă este aplicabilă unei game largi de sulfuri de cupru (Hutchins, Davidson și Brierley, 1986), ca de exemplu:

*Calcopirită*: $CuFeS_2 + 2\,Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow CuSO_4 + 5\,FeSO_4 + 2\,S^\circ$

*Calcocit*: $Cu_2S + 2\,Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow CuSO_4 + 4\,FeSO_4 + S^\circ$

*Covelit*: $CuS + Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow CuSO_4 + 2\,FeSO_4 + S^\circ$

*Bornit*: $Cu_5FeS_4 + 6\,Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow 5\,CuSO_4 + 13\,FeSO_4 + 4\,S^\circ$

Sulful elementar ($S^\circ$) produs în aceste reacții poate fi convertit de *T. ferrooxidans* la acid sulfuric: $2\,S^\circ + 3\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,H_2SO_4$. Aceasta menține un mediu acid favorabil bacteriilor și, în plus, solubilizează o serie de oxizi ai cuprului (Hutchins, Davidson și Brierley, 1986; Karavaiko, 1982), ca de exemplu:

*Azurit*: $Cu_3(OH)_2(CO_3)_2 + 3\,H_2SO_4 \rightarrow 3\,CuSO_4 + 2\,CO_2 + 4\,H_2O$

*Chrisocol*: $CuSiO_3 \cdot 2\,H_2O + H_2SO_4 \rightarrow CuSO_4 + SiO_2 + 3\,H_2O$

*Tenorit*: $CuO + H_2SO_4 \rightarrow CuSO_4 + H_2O$

**Biosolubilizarea directă**

Aceasta se realizează fără participarea sulfatului feros produs pe cale bacteriană, deoarece metalele sînt eliberate din minereul insolubil direct, prin metabolismul oxidativ al microorganismelor. Existența acestei modalități de lesiere a fost bănuită după ce s-a descris legarea fizică a bacteriilor de suprafața sulfurilor metalice (Berry și Murr, 1978).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În acest proces, bacteriile atacă componenții minerali susceptibili de oxidare, transferind, în cursul metabolismului lor energetic, electronii de la Fe sau S pe atomii de oxigen. Procesul este deci aerob și este mediat de proteine de transport, care transferă electronii eliberați în cursul reacțiilor de oxidare, de la nivelul membranei celulare la cel al atomilor de oxigen. Existența acestui mecanism a fost demonstrată experimental, prin expunerea unor sulfuri metalice preparate sintetic, lipsite de Fe, la acțiunea bacteriei *T. thiooxidans*. Interacțiunea evoluează cu consum de oxigen și are drept consecință solubilizarea metalului după reacția :

$$SM + 2O_2 \rightarrow MSO_4$$

(în care M este un metal bivalent) (Torma, 1982).

Adăugarea de Fe feric ($10^{-2}$ — $10^{-4}$ M) dublează rata de extracție.

Rolul comparativ al celor două mecanisme de biosolubilizare — direct și indirect — este greu de estimat. Cum Fe este aproape totdeauna prezent în mediile naturale în care au loc procese de lesiere, ele ar putea avea loc simultan. Mai precis, procesul ar putea începe prin lesierea directă, care eliberează Fe, după care s-ar declanșa imediat reacțiile lesierii indirecte.

**Conversia galvanică**

Aceasta reprezintă a treia cale de solubilizare a metalelor (Berry și Murr, 1978). Ea se bazează pe principiul general admis după care contactul fizic dintre două sulfuri metalice diferite, scufundate într-un electrolit, creează o celulă galvanică.

Fenomenul a fost studiat în cazul cuplului $CuFeS_2/FeS_2$, având ca electrolit un amestec de acid sulfuric diluat și o soluție de sulfat feric. În acest sistem, calcopirita ($CuFeS_2$) are un potențial electric mai mic și devine anod, în timp ce pirita ($FeS_2$) se comportă ca un catod. Ca urmare, calcopirita este solubilizată rapid, în timp ce pirita rămîne neafectată.

Bacteria *T. ferrooxidans* poate favoriza evoluția acestui proces, prin oxidarea sulfului elementar ($S^0$) produs pe această cale, care altfel ar deveni o barieră fizică a sistemului, împiedicînd difuzia Cu și Fe din zona de reacție.

Nu se cunoaște contribuția acestei modalități de solubilizare în condiții naturale.

**Biosolubilizarea uraniului**

Tehnologia de lesiere a uraniului, aplicată relativ recent (Harrison și colab., 1966), și utilizată în special în Canada, constă în „stropirea" sau „inundarea" regiunilor în care exploatarea convențională a încetat sau a tunelelor cu o soluție foarte diluată de $H_2SO_4$. Se creează condiții de aciditate, adecvate multiplicării bacteriilor din acest habitat.

Biosolubilizarea uraniului se realizează indirect, prin acțiunea *T. ferrooxidans*, care oxidează pirita și Fe feros, declanșînd oxidarea mediată ciclic ($Fe^{2+}/Fe^{3+}$) a oxidului uranos ($UO_2$), cunoscut ca uraninit.

După Hutchins, Davidson și Brierley (1986), reacțiile sînt următoarele :

$$UO_2 + Fe_2(SO_4)_3 + 2\ H_2SO_4 \rightarrow UO_2(SO_4)_3^{4-} + 2\ FeSO_4 + 4\ H^+$$

$$UO_3 + 3\ H_2SO_4 \rightarrow UO_2(SO_4)_3^{4-} + H_2O + 4\ H^+$$

Sulfatul uranos este solubil ca uraniul tetravalent. Soluția care conține uraniu drenează spre regiunile declive ale minei și ulterior în colectoare de apă de unde este apoi pompată la suprafață, unde are loc recuperarea.

**Aplicații practice și perspective**

Deși este cunoscută de secole, tehnica biosolubilizării nu s-a impus atît timp cît au existat minereuri bogate și resurse energetice suficiente. În ultim, perioadă, tot mai multe țări recurg la aceste procedee, în special pentru Cu pentru uraniu și pentru recuperarea aurului din zăcămintele refractare, deși tehnologiile sînt încă rudimentare.

Procedeele de biosolubilizare se aplică *in situ*, în subteran, în minele abandonate sau în zăcămintele sărace de Cu și uraniu, și la suprafață în acumulări create ad-hoc de haldele de steril.

Se folosesc, în general, bacterii autohtone. Instalațiile mari prezintă riscuri, legate de dificultățile de circulație a aerului și de formare a unor zone impermeabile la fluxul lichidelor (prin compactare sau prin formare de precipitate de gips ($CaSO_4$), hidroxid feric ($Fe(OH_3)$) și sulfat feric bazic, care reduc circulația apei și suprafața de contact dintre rocă și suspensia de microorganisme. În aceste condiții, solubilizarea este influențată de o serie de factori ca : fluctuațiile de pH și $E_h$, prezența $O_2$ și a $CO_2$, fluctuațiile în natura și concentrația nutrienților, tensiunea superficială, suprafața zonei de atac și concurența bacteriilor „sălbatice" din habitat.

Deși procedeul este foarte lent, biosolubilizarea bacteriană rămîne o alternativă biotehnologică eficientă pentru recuperarea metalelor din minereurile sărace, din sisteme acvatice sau recalcitrante la degradare.

Utilizat pentru cupru, uraniu și, în unele țări, pentru aur, procedeul poate fi adaptat și pentru Zn (din ZnS — blendă) și Pb (din galeria PbS), iar în viitor pentru Ni și Co. În prezent, 12 — 13% din producția mondială de uraniu este obținută prin biosolubilizare, iar în viitorul apropiat se preconizează o extindere la 25%. Teoretic, procedeul poate fi extins cu aceeași eficiență la alte metale sau metaloide ca : molibden, galiu, germaniu, vanadiu, mangan, arsen, stibiu, seleniu, bismut (Brierley, 1990).

În perspectivă, se apreciază că extinderea spectrului de microorganisme active ar putea grăbi rata biosolubilizării, extinderea aplicației la noi metale, iar cunoașterea mecanismelor de acțiune ar putea permite reglarea proceselor metabolice. Obținerea de tulpini noi reprogramate genetic, cu eficiență sporită sau toleranță mai mare la metale, reprezintă o perspectivă mai îndepărtată, deoarece structura genetică a microorganismelor implicate în levigare este necunoscută.

# DEGRADAREA MICROBIANĂ A SUBSTANȚELOR XENOBIOTICE

„În ultima jumătate a secolului XX a devenit axiomatic faptul că microorganismele nu sînt infailibile și că mulți compuși organici sînt recalcitranți și se acumulează în mediu"

M. ALEXANDER

Capacitatea microorganismelor de a degrada mai mult sau mai puțin ușor diferitele molecule complexe existente în natură este recunoscută fără echivoc. În acest sens pledează imposibilitatea acumulării în mediu chiar a celor mai greu degradabile și reînnoibile anual (celuloză, hemiceluloze, lignină etc.), precum și rolul esențial al microorganismelor în circulația elementelor biogene în natură. Atunci cînd s-a realizat (ca în cazul combustibililor fosili), acumularea s-a produs numai în condiții de mediu nefavorabile pentru biodegradare.

Aceste observații au dus la formularea *principiului infaibilității microorganismelor* („Principle of microbial infaillibility") (Alexander, 1965), conform căruia, în ultimă instanță, orice substanță este degradată de un microorganism sau de un grup de microorganisme, cu condiția existenței unor condiții de mediu favorabile.

Obținerea pe cale de sinteză a numeroase substanțe organice cu grade diferite de complexitate și importante utilizări practice în agricultură — ca pesticide * pentru combaterea dăunătorilor precum și în industrie, medicină etc. — a infirmat această doctrină, demonstrînd caracterul refractar la degradarea microbiană a multor substanțe diferite chimic de cele obișnuite sistemelor biologice.

*Substanțele xenobiotice* (străine de sistemele biologice) sînt substanțe chimice organice sintetice, care sînt introduse în ecosistemele naturale, fie în mod deliberat, fie accidental. Fiind, în general, rezistente la biodegradare, se pot acumula în concentrații care depășesc anumite limite de toleranță, determinînd efecte negative asupra organismelor vii datorită persistenței și concentrării lor, precum și dificultății de a fi introduse în circuitul global al elementelor biogene (C, N, S etc.).

Numărul substanțelor obținute prin sinteză chimică este enorm. După Jain și Steiller (1986), în anii '80 erau înscriși în „Chemical Abstracts" peste 5 milioane de compuși chimici, iar producția anuală de compuși organici de sinteză era de 300 milioane tone/an. Unii dintre ei sînt biodegradabili, dar cei mai mulți sînt „recalcitranți".

---

* Termenul de pesticid este folosit de unii autori (Clarke, 1980; Lincoln, Boxhall și Clark, 1982 etc.) în sens limitat pentru substanțele chimice utilizate în combaterea dăunătorilor de origine animală (insecticide, rodenticide), dar cei mai mulți îl folosesc într-un sens larg, extinzîndu-l la alte substanțe, în general de sinteză, active ca erbicide sau fungicide.

### Clasificarea substanțelor xenobiotice cu caracter de poluanți ai mediului înconjurător

Pe baza compoziției chimice, substanțele xenobiotice poluante sînt grupate în trei categorii majore: 1) compușii organoclorurați; 2) alchilbenzen-sulfonați; 3) compușii organo-fosforici.

**Compușii organoclorurați** sau mai exact organohalogenați (deoarece unii pot conține și atomi de fluor) reprezintă grupul cel mai numeros și mai mult studiat. Este reprezentat de o gamă largă de compuși cu proprietăți fizico-chimice foarte diferite și grade diferite de rezistență la degradare. Cuprinde molecule obținute prin adiția de clor sau fluor la unele hidrocarburi alifatice, aromatice sau heterociclice.

Legătura C—Cl sau C—F este foarte stabilă și necesită consum de energie pentru clivare. Ea conferă stabilitate chimică și biologică, dar agravează efectul de poluant deoarece asigură o persistență îndelungată în mediu (fig. 351).

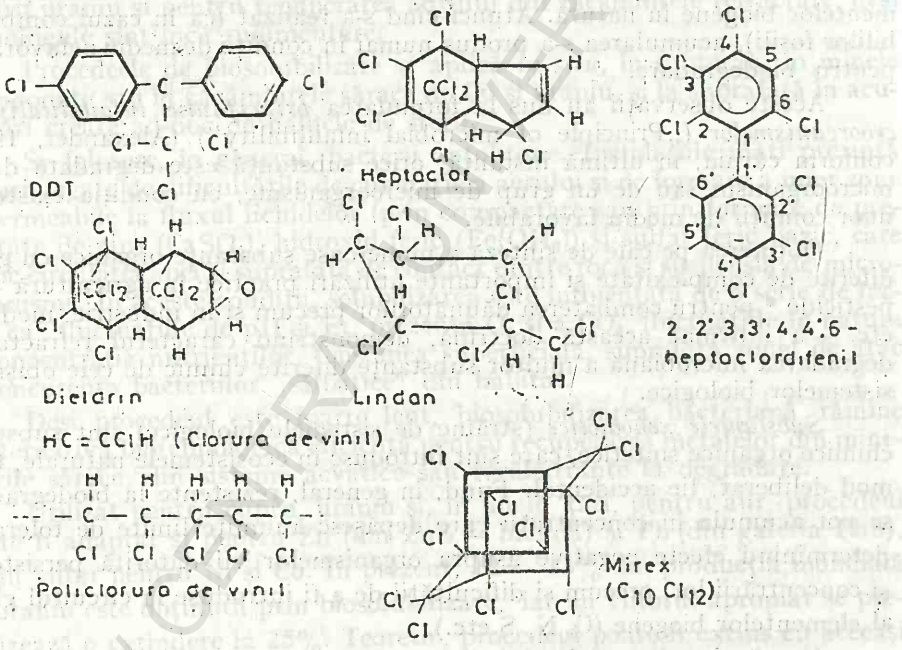



Fig. 351. — Formulele structurale ale cîtorva substanțe xenobiotice. Clorinarea extensivă face acești compuși extrem de rezistenți la biodegradare.

Compușii organoclorurați au utilizări multiple în agricultură, medicină și în industrie.

a) *Substanțele insecticide*, reprezentate de:

— *DDT* (4,4-diclorfenil-tricloretan), cel mai cunoscut și mai mult studiat, aplicat încă din anul 1943;

— *Lindan*, izomer al hexaclorciclohexanului (HCH), mai activ, avînd o toxicitate pentru insecte de 5—20 de ori mai mare decît DDT.

— *Derivați ai ciclopentandienului*, ca aldrin, dieldrin, heptaclor, interziși în unele țări datorită toxicității lor pentru nevertebrate și chiar pentru vertebrate.

b) *Bifenilii policlorurați* (BPC) sînt amestecuri de bifenil, avînd 1—10 atomi de clor per moleculă. Au o mare stabilitate biologică și o inerție chimică proporțională cu creșterea gradului de clorinare.

Sînt substanțe uleioase, cu punct ridicat de fierbere și cu utilizări multiple: ca izolatori sau cu rol de răcire în sistemele electrice închise (transformatori, condensatori), lichide hidraulice și de transfer de căldură, în ignifugare, industria lacurilor și a vopselelor, a cernelurilor tipografice, ca aditivi, auxiliari în industria textilă, pesticide etc. O utilizare mai banală este cea de ulei de imersie pentru microscopie.

Produși inițial în anul 1929, au fost sintetizați după datele lui Reineke și Knackmuss (1988) în cantitate de 750 000 tone din care aproximativ 450 000 tone sînt „în serviciu", iar restul de aproximativ 300 000 tone au fost larg diseminate în mediu.

Mulți compuși clorinați ai benzenului sînt utilizați curent ca intermediari în sinteza unor chimicale fine și pătrund în mediu fie ca reziduuri, fie că sînt accidental „scăpate" din locurile de producție. Apreciind pierderile la 1—2% din materialul brut, cantitățile eliminate în mediu sînt apreciate la cîteva sute de tone/an.

*Dioxinele*, prezente în aproximativ 60 de formule chimice, au ca reprezentanți tipici: 2, 3, 7, 8-tetraclor-dibenzo-dioxina (TCDD) și 2, 3, 7, 8-tetraclor-dibenzen-furanul (TCDF). Sînt substanțe care apar în cursul fabricării sau al degradării termice a clorfenolilor sau clorbifenililor. TCDD este rezistentă la degradare și capabilă de efecte toxice pentru om în concentrații foarte mici. Efectele negative determinate de contaminările accidentale (ca în cazul localității Sovéto din Italia) sînt, după unii autori, exagerate, cel puțin sub aspectul efectului teratogen. Dioxina TCDD este degradată de *Phanerochaete chrysosporium (Basidiomycetes)*.

c) *Freonii* sau foranii sînt hidrocarburi alifatice cu g.m. mică respectiv alcani $C_1$—$C_2$, în care toți sau aproape toți atomii de H sînt înlocuiți de combinații fluor—clor. Cei mai cunoscuți sînt freonii F-11 ($CCl_3F$), F-12 ($CCl_2F_2$) și foranul 114 ($CF_2Cl$—$CF_2Cl$).

Sînt gaze inerte, foarte volatile, utilizate ca solvenți sau ca propulsori pentru dispozitive de spray în cosmetică, vopsele, insecticide, precum și în sisteme de răcire (frigidere, aparate de condiționare a aerului).

Fotolizați în atmosferă, unde sînt eliminați în cantități mari ($10^6$ tone/an), sînt incriminați în distrugerea parțială a stratului de ozon, avînd drept consecință negativă creșterea iradierii UV, riscul unor procese de mutageneză și de favorizare a cancerului pulmonar. Există și păreri opuse în sensul că „gaura" din stratul de ozon observată deasupra Antarcticii există, probabil, dintotdeauna sau că oricum nu ar fi de dată recentă, că un produs fabricat și utilizat mai ales în emisfera nordică nu poate produce efecte negative concentrate în emisfera sudică, că perenitatea stratului de ozon ar fi asigurată de refacerea continuă prin bombardamentul permanent cu UV asupra oxigenului din stratosferă etc. (Tazieff, 1989).

d) *Polimerii sintetici*, de tip polietilenă, clorură de polivinil, polistiren etc., sînt foarte răspîndiți datorită utilizărilor lor numeroase, bazate pe elasticitatea, capacitatea de modelare, rezistență mecanică și la acțiunea substan-

țelor chimice ca material de împachetat, precum și în industrie, medicină și agricultură. Rezistența lor la degradare pare să fie asociată cu greutatea moleculară mare. Ca dovadă, fragmentele mici, obținute prin piroliza polietilenei, sînt susceptibile de degradare. Unii polimeri sintetici, ca, de exemplu, polietilena par să reziste la biodegradare indefinit.

Sînt produse în cantități foarte mari anual (7 milioane de tone în anul 1976). Sînt netoxice și, ca atare, nepericuloase pentru organismele din natură, însă prezența lor este nedorită, în primul rînd, din considerente de ordin estetic.

2) **Alchil-benzen-sulfonații (ABS)** sînt componenți majori ai detergenților anionici, datorită capacității lor de surfactanți. Sînt complexe organice cu molecule amfipatice, a căror activitate de suprafață are ca efect „muierea", desorbția, emulsionarea, suspendarea și stabilizarea particulelor dislocate de pe o suprafață. Rezultatul acestor efecte succesive este detergența sau curățirea.

Molecula lor are o structură asimetrică, cu o extremitate alchil, hidrofobă (deci lipofilă), și una sulfonat, hidrofilă. Cînd un astfel de agent tensioactiv aflat în soluție apoasă vine în contact cu o suprafață lipidică moleculele lui se orientează în așa fel încît grupările lor hidrofobe (alchil) se adsorb pe aceasta, iar cele hidrofile, polare (sulfonat), rămîn orientate spre apă. Se creează astfel un monostrat de adsorbție, care face legătura între cele două medii insolubile, apa și lipidele determinînd efectul de „muiere".

Sînt rezistenți la degradare și produc spumă la suprafața apelor poluate. Începînd din anii 70, unii detergenți sînt primele molecule construite de producători pentru a fi biodegradabile.

## EFECTELE ECOLOGICE ALE SUBSTANȚELOR XENOBIOTICE

Substanțele xenobiotice pot polua, practic, toate cele trei medii naturale majore, respectiv atmosfera, litosfera și hidrosfera.

După Reinecke și Knackmuss (1988), există două modalități de poluare cu substanțe chimice:

1) *Poluarea localizată* („Point source pollution") realizată pe zone mici, în locuri asociate cu efluenți industriali, accidente de transport sau de utilizare și în care poluantul poate fi eliminat în concentrații relativ mari.

2) *Poluarea dispersată* („Dispersed pollution") realizată în concentrație mică, în general pe suprafețe mai extinse, rezultînd din volatilizare, practici agricole (ca, de exemplu „spălarea" prin șiroire a insecticidelor de pe sol și transportul lor în rîuri și lacuri sau în pînza freatică etc.).

Unele aplicații și introducerea în mediu sînt intenționate (combaterea dăunătorilor), altele accidentale sau oricum neintenționate (reziduuri industriale din fabrici, din industria alimentară, accidente în cursul vehiculării sau prin transport secundar la distanță de regiunea-țintă prin apă, aer, eroziunea solului, infiltrare etc.

Efectele poluante sînt agravate de marea diversitate a pesticidelor. Astfel, în anul 1975 se foloseau 1 170 de compuși, din care 425 erbicide, 410 fungicide și 335 insecticide produse într-o cantitate de 725 000 tone/an. După Mennecke (1981), în emisfera vestică se foloseau în anul 1979 peste 500 de pesticide diferite, disponibile în peste 5 000 de formule comerciale numai în agricultură. Producția anuală a fost de 2 milioane de tone.

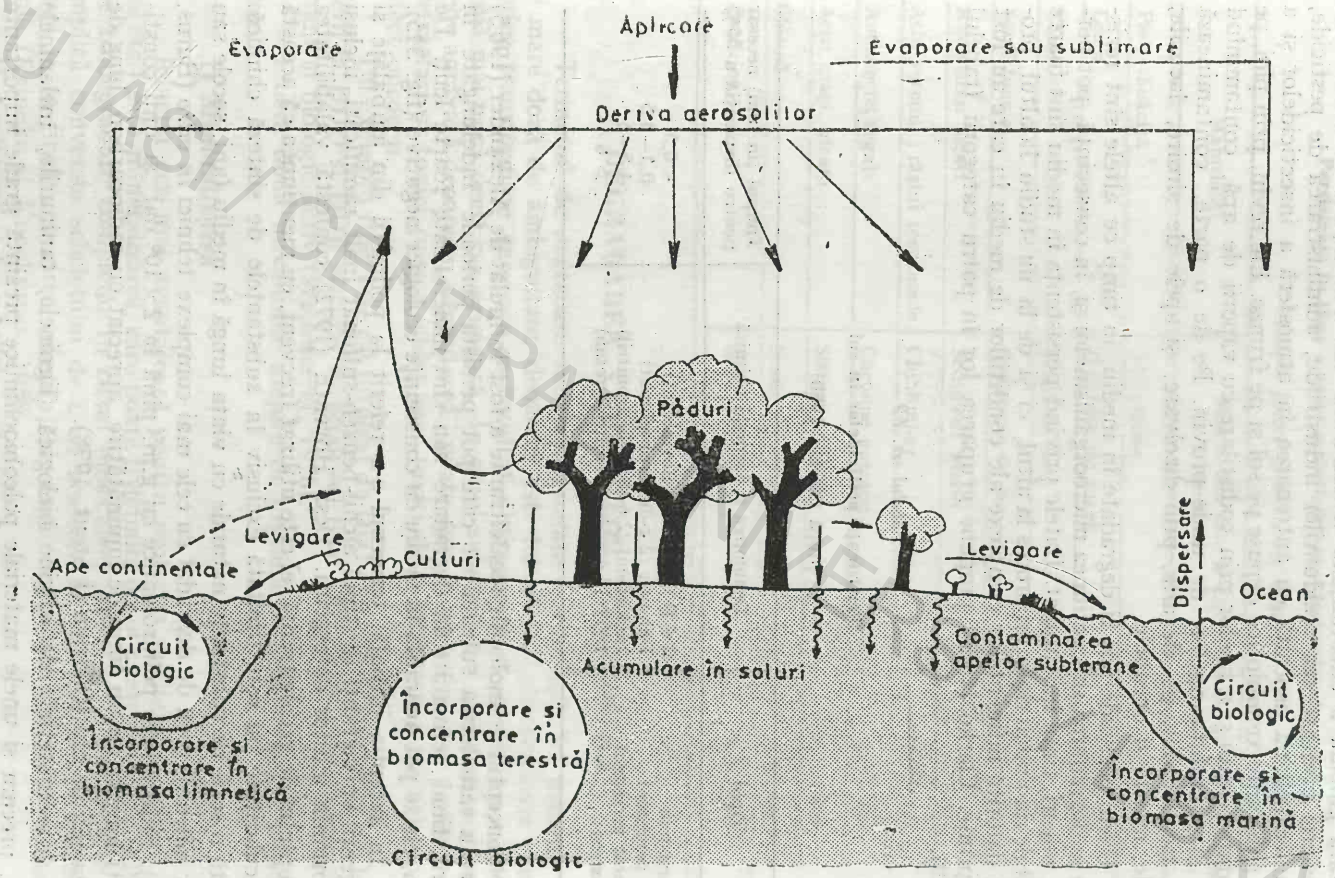



Fig. 352. — Căile de dispersare și de circulație a substanțelor xenobiotice la nivel global (după Ramade, 1976).

BCU IAȘI / CENTRUL VECHI / LIBRARY

Figura 352, după Ramade (1976), prezintă sintetic căile de dispersare pe scară globală a substanțelor xenobiotice. Ea evidențiază contaminarea troposferei prin arderea reziduurilor industriale, administrarea de pesticide, eroziunea eoliană asociată cu antrenarea în atmosferă a insecticidelor și a altor substanțe xenobiotice depuse pe sol și pe frunze. Ele revin, prin ploi, pe suprafața solului și a apelor prin codistilare cu vaporii de apă, contaminînd solul și suprafața apelor, de unde provin. Pe de o parte, contaminează apele freatice, iar, pe de alta, prin dizolvare, și apele de șiroire, lacurile, rîurile, mările și oceanele.

Unele pesticide pot fi degradate în mediu, în timp ce altele sînt rezistente la degradarea sub acțiunea microorganismelor și, în consecință, pot persista, uneori, timp îndelungat. Datele privind persistența în mediu sînt foarte variabile nu numai de la un proces la altul, ci și de la un studiu la altul, probabil datorită influențelor complexe ale condițiilor de mediu în care au fost întreprinse. Clarke (1980) propune gruparea lor în patru categorii (tabelul nr. 69).

*Tabelul nr. 69*

**Persistența pesticidelor în sol**

(după Clarke, 1980)

| Tipul | Denumirea și formula chimică | Timpul (în luni) necesar pentru dispariția a 50% |
|---|---|---|
| Nepersistent | 2,4-D (2,4-diclorfenoxiacetat) | $<0,5$ |
| Slab persistent | Dalapon (2,2-diclorpropionat) | 0,5—1,5 |
| Moderat persistent | Diclorbenil (2,6-diclorbenzonitril) | 1,5—6 |
| Persistent | DDT (4,4-diclordifeniltricloretan) | $>6$ |

Conceptul de molecule recalcitrante a fost formulat de Alexander (1965) pentru a caracteriza substanțele care pot persista perioade îndelungate în natură, fiind refractare la degradare sau sînt mineralizate foarte lent. De aceea, ele se pot acumula în mediu cu consecințe ecologice negative (fig. 345).

În accepția inițială, termenul s-a referit la polimerii din ambalaje și la agenții surfactanți de tipul alchil-benzen-sulfonat înalt ramificați, incluși în formula multor detergenți. Deși Horvath (1972) contestă valabilitatea conceptului de recalcitranță, el este utilizat frecvent, cu mențiunea că această particularitate nu este limitată exclusiv la substanțele de sinteză chimică. Există o serie de substanțe naturale cu viața lungă în mediu (ani, secole sau chiar milenii), greu de degradat cu cele mai complexe tehnici *in vitro* (Burns, 1983). Substanțele poliaromatice cu g.m. pînă la $2 \times 10^6$ dal și unii constituenți humici au un timp de înjumătățire, apreciat cu radiocarbon, lung de cîteva mii de ani (O'Brien și Stout, 1978).

Alte materiale de origine biologică (ligninele, taninurile, melaninele etc.), precum și unele materiale paleobiochimice prezintă grade importante de „recalcitranță" (tabelul nr. 70).

*Tabelul nr. 70*

**Persistența în timp a unor materiale paleobiochimice naturale**

(după Janke și Fritsche, 1988)

| Materialul | Mediul din care a fost recoltat | Virsta materialului (ani) |
|---|---|---|
| Piele tăbăcită | Sol argilos | $1,9 \times 10^3$ |
| Lemn | Depozite de turbă | $> 1,9 \times 10^4$ |
| Nămol | Fund de lac | $2,4 \times 10^4$ |
| Spori fungici | Sediment de lac | $3,0 \times 10^4$ |
| Aminoacizi legați | Sediment marin | $3,0 \times 10^7$ |
| Acid succinic; rășini terpenoide | Chihlimbar | $4,0 \times 10^7$ |
| Aminoacizi legați | Cărbune antracit | $2,5 \times 10^8$ |
| Acizi grași, alcani | Șisturi argiloase | $3,5 \times 10^8$ |
| Chitină | Fosile de *Hyolithellus* | $5,5 \times 10^8$ |
| Porfirine | Roci sedimentare | $3,0 \times 10^8$ |

## DEGRADAREA COMPUȘILOR XENOBIOTICI

Termenul de degradare sau biodegradare este folosit, în general, cu o mare doză de ambiguitate, deoarece este folosit fără discriminare pentru orice transformare care are ca rezultat obținerea unui produs cu o moleculă mai mică decît cea originară. În cazul substanțelor xenobiotice situația este agravată deoarece „degradarea" poate duce la apariția unor produși noi, refractari și toxici (uneori chiar mai toxici decît produsul originar) sau cu efect oncogen.

Un exemplu tipic este cel furnizat de DDT (fig. 353), convertit de bacterii la DDD și DDE și chiar la produsul final DBP, care este încă recalcitrant și biologic activ (Wedemeyer, 1976).

Există două mecanisme majore de degradare a substanțelor xenobiotice.

### 1) Mineralizarea

Reacția cea mai avantajoasă pentru protecția mediului natural (apă, sol etc.) este mineralizarea, care poate fi definită drept consecința unui proces de biodegradare completă. În cazul moleculelor xenobiotice halogenate, ea implică conversia scheletului de C al acestora la intermediari de metabolism și, în final, revenirea substanțelor organice halogenate la starea minerală (Reineke și Knackmuss, 1988).

Mineralizarea este condiționată de:

1) pătrunderea substanțelor străine în celule;

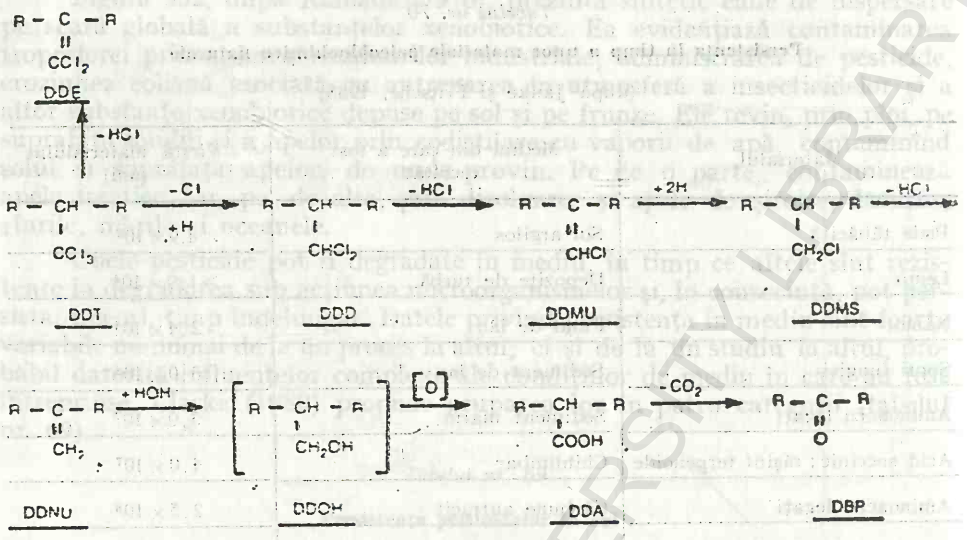



Fig. 353. — Transformările insecticidului DDT sub acțiunea bacteriei *Enterobacter aerogenes*. Toate transformările sînt limitate la regiunea $-CCl_3$. Condițiile de anaerobioză favorizează etapele de declorinare. Produsul final DBP este încă recalcitrant și biologic activ: R = regiunea p-clor-fenil.

Cheia abrevierilor: DDT = 1, 1, 1-triclor-2, 2-bis (p-clorfenileţan); DDE = 1, 1-diclor-2,2-bis (p-clorfenil) etilenă; DDD = 1,1-diclor-2,2-bis (p-clorfenil) etan: DDMU = 1, clor-2,2-bis (p-clorfenil) etilenă: DDMS = 1, clor-2,2-bis (p-clorfenil) etan; DDNU = unsym-bis (p-clorfenil) etilenă; DDOH = 2,2-bis (p-clorfenil) etanol; DDA = 2,2-bis (p-clorfenil) acetat; DBP = 4,4'-diclorbenzofenonă (după Wedemeyer, 1976).

2) existența unor sisteme enzimatice degradative aparținînd metabolismului „periferic", cu rolul de îndepărtare a structurilor xenobiotice și de conversie a substanțelor într-o formă „naturală";

3) existența unor mecanisme de reglare susceptibile să fie activate la nevoie.

Procesul de mineralizare permite eliberarea mai mult sau mai puțin rapidă a pesticidelor (cel mai adesea pe durata unui anotimp).

El are următoarele caracteristici fundamentale:

1) Secvențele enzimatice sînt caracteristice metabolismului microorganismelor și convertesc, final, substanțele organice originare la substanțe anorganice;

2) O parte din carbonul prezent în substrat este convertit la constituenți celulari, iar energia este utilizată pentru sinteza lor. Ca urmare, mineralizarea este asociată cu creșterea numărului și a biomasei microorganismelor;

3) Este asociată cel mai adesea cu detoxifierea. În cazul în care unul dintre produșii intermediari este tipic, el poate exercita efecte nocive asupra mediului, dar, în general, aceștia au viață scurtă.

### 2) Co-metabolismul

**„În prezent, dispunem de numeroase probe privind degradarea co-metabolică a poluanților din mediu de către microorganismele prezente în mod natural și importanța acestui fenomen în ecosistem".**

R. S. HORVATH

Numeroși compuși xenobiotici și, în principal, pesticidele organoclorurate nu pot fi folosite de microorganisme ca unică sursă de C și energie, și, ca urmare, nu pot fi îndepărtate din mediu. După cum s-a demonstrat ele pot fi însă modificate pe cale biologică, în natură, prin acțiunea unor populații mixte de microorganisme.

În aceste cazuri, în cultură pură, nici un organism nu poate folosi substratul respectiv pentru creștere, dar în prezența unei surse alternative de C și energie îl poate modifica, transformîndu-l chimic, încît, adeseori, poate fi utilizat în continuare de alte organisme (Slater și Sommerville, 1979).

Procesul prin care un substrat este modificat, fără să fie utilizat, de către un microorganism, care crește pe alt substrat, a fost descris prima dată de Leadbetter și Foster (1958) la *Methylomonas methanica*.

Această bacterie utilizează pentru creștere metanul și realizează, concomitent, un proces de oxidare a diferite alte cosubstraturi prezente în mediu ca, de exemplu, etanul la acid acetic, propanul la acid propanoic și acetonă, butanul la acid butanoic și metilacetonă etc. Bacteria metanotrofă utilizează pentru creștere numai substratul ($C_1$) caracteristic tipului său de nutriție. Ea nu poate utiliza ca unică sursă de C și energie nici cosubstraturile enumerate și nici produșii oxidării lor.

Procesul prin care o bacterie oxidează o substanță fără ca să fie capabilă să o utilizeze ca sursă de C și energie pentru creștere a fost numit de Foster (1962) *co-oxidare*.

Ulterior, Jensen (1963) a propus termenul de *co-metabolism* pentru a include și alte reacții (dehalogenări etc.) și pentru a scoate în evidență necesitatea prezenței concomitente a unui substrat menit să asigure creșterea.

*Conceptul de co-metabolism* a fost redefinit de Skryabin și colab. (1978), precum și de Stirling și Dalton (1979, 1982) pentru a caracteriza procesul de transformare a unui substrat, care nu permite creșterea unui microorganism („Non-growth substrate"), în prezența unui substrat de creștere sau a altui compus transformabil.

În acest context, degradarea unor compuși organici rezistenți la atacul unui microorganism devine posibilă dacă sistemul substrat — mediu — microorganism este suplimentat cu unul sau cu mai multe substraturi adiționale, utilizabile pentru creștere de către microorganismul respectiv. Microorganismul astfel „ajutat" este capabil să degradeze substratul respectiv, dar rămîne în continuare incapabil să-l folosească drept sursă de C și energie pentru creștere.

Conceptul de co-metabolism a fost criticat de alți autori. Holbert și Krawiec (1977) consideră că reacțiile respective nu reprezintă evenimente metabolice noi (aparținînd anabolismului și catabolismului normal), ci doar

o abordare metodologică nouă, decurgînd din cuplarea la nivel celular a metabolismului a două substraturi, unul xenobiotic („non-growth") și altul de creștere.

Procesele de co-metabolism au următoarele caracteristici majore:

1) Au loc numai în medii naturale (apă, sol etc.) nesterile și niciodată în cele sterilizate;

2) Nu se poate izola niciodată un singur microorganism capabil să utilizeze substanțele xenobiotice în mod eficient ca sursă de nutrienți și de energie;

3) Populația răspunzătoare de degradare nu crește ca număr sau ca biomasă în urma introducerii substratului respectiv în apă sau în sol. Explicația rezidă în faptul că populațiile de microorganisme care fac co-metabolism sînt mici, degradarea compușilor expuși este lentă și rata multiplicării lor nu crește în timp, cum este cazul microorganismelor care metabolizează diferite substraturi pînă la mineralizare (Alexander, 1981, fig. 354);

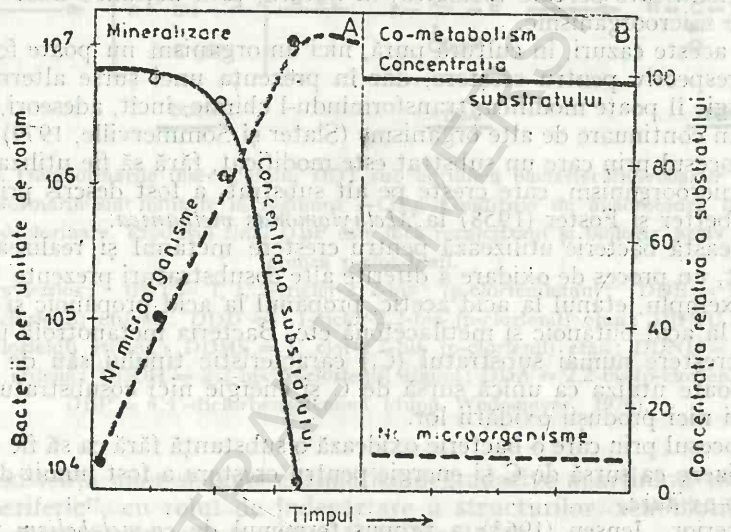



Fig. 354. — Modificările populației de microorganisme și ale concentrației unui substrat chimic xenobiotic în cursul mineralizării și al co-metabolismului lor (după Alexander, 1981).

4) Produșii rezultați din co-metabolism sînt lipsiți, de cele mai multe ori, de orice funcție metabolică, dacă nu sînt atacați în continuare de alte enzime aparținînd catabolismului. De aceea, o particularitate frecvent observată a co-metabolismului este acumularea în mediu a compușilor intermediari, care nu mai pot fi metabolizați mai departe de anumite microorganisme (Janke și Fritsche, 1985).

Procesul de co-metabolism este activ în degradarea unor pesticide comune (DDT, 2,5-T, aldrin, heptaclor) și a mai multor alte molecule clorinate și neclorinate (Clarke, 1980).

### Procesele de co-metabolism în natură

Date experimentale și observații asupra unor procese naturale pledează pentru prezența și importanța co-metabolismului în natură.

Astfel, degradarea ligninei la $CO_2$ sub acțiunea a doi fungi care produc putregaiul alb *(Phanerochaete chrysosporium* și *Coriolus versicolor)* necesită

prezența unui substrat de creștere, ca glucoza sau celuloza. Ceva mai mult, cantitatea de lignină degradată depinde de cantitatea de substrat de creștere adițional (Kirk și colab., 1976), iar creșterea fungilor cu lignină, ca unică sursă de C și energie, este neînsemnată, deși ca substrat nu este toxică.

În sol, prezența unei game largi de substanțe organice excretate de rădăcinile plantelor, în particular în rizosferă, creează condiții favorabile pentru co-metabolismul substanțelor refractare la degradare, în special al celor xenobiotice (Janke și Fritsche, 1985). Viteza de mineralizare a două pesticide organofosforice (parathion și diazinon) este mai mare sub influența rădăcinilor plantelor decît în probele de sol identice însă lipsite de rădăcini.

Nu s-a demonstrat însă dacă stimularea este asociată cu modificarea activității globale a microorganismelor sau cu selecționarea unor populații mai active în degradarea compușilor organofosforici (Hsu și Bartha, 1979). După Skryabyn (1978), rolul primordial al substratului adițional conținînd C metabolizabil, necesar pentru a realiza co-metabolismul, este de a furniza energie, cofactori sau alți metaboliți necesari pentru transformarea substratului recalcitrant (fig. 355).

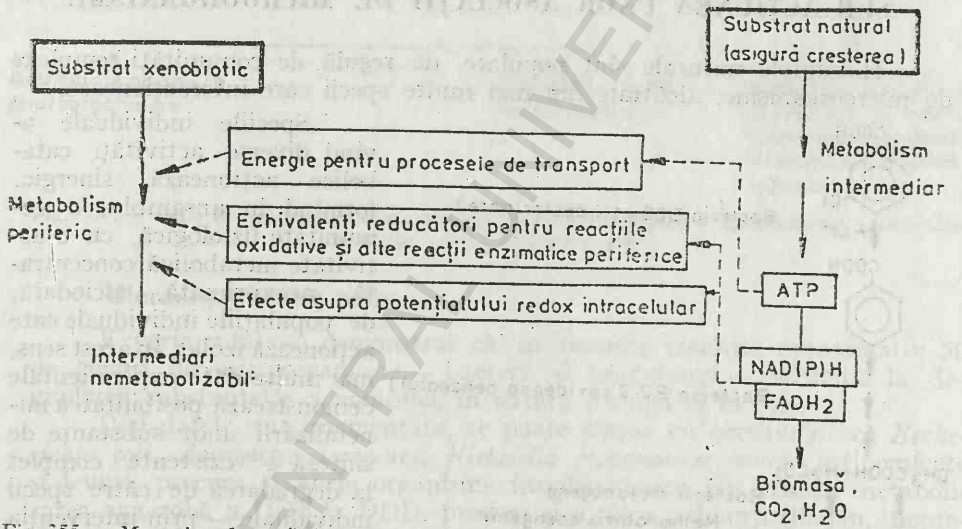



Fig. 355. — Mecanismele posibile ale proceselor de co-metabolism în cursul degradării de către microorganisme a unor substanțe xenobiotice care nu pot fi folosite ca sursă de nutrienți și energie („non-growth substrate") (după Janke și Fritsche, 1985).

În general, populațiile de microorganisme capabile să co-metabolizeze în natură sînt reduse, iar numărul și biomasa lor nu cresc rapid prin introducerea substratelor recalcitrante în mediu. De aceea, co-metabolismul substanțelor xenobiotice în ecosistemele naturale are loc cu o viteză mică, permițînd acumularea de intermediari nemetabolizabili și, în unele cazuri, chiar a unor compuși mai toxici decît cei inițiali (Alexander, 1980, 1981).

Condițiile existente în multe medii naturale (în special în mediile acvatice), care au concentrații reduse de compuși naturali cu carbon ușor utilizabil, nu oferă multe avantaje selective microorganismelor capabile să co-metabolizeze substanțele xenobiotice („non-growth"). Cu toate acestea, fenomenul de co-metabolism este foarte important pentru procesele de bio-

degradare care au loc în mediu și datorită cărora diferite substanțe eliminate permanent în natură se acumulează foarte rar, deși prezintă diferite grade de rezistență.

Deși este greu de apreciat în prezent cît din biodegradarea moleculelor organice complexe sau recalcitrante revine metabolismului și cît co-metabolismului este evident că foarte multe dintre cele care nu permit creșterea nici unui organism individual sînt degradabile în sol și în bazinele acvatice în prezența unor populații complexe (Beam și Perry, 1974).

Mediile naturale impun frecvent condiții restrictive pentru creșterea microorganismelor. Aceasta se realizează cu o viteză mult mai scăzută decît *in vitro*, în laborator, sau este chiar oprită cînd concentrația nutrienților este foarte scăzută. În aceste condiții, co-metabolismul poate reprezenta o cale alternativă prin care microorganisme importante pot fi aprovizionate cu nutrienții necesari pentru creștere și pentru activitățile lor biologice normale.

## DEGRADAREA COMPLETĂ A SUBSTANȚELOR XENOBIOTICE SUB ACȚIUNEA UNOR ASOCIAȚII DE MICROORGANISME

Habitatele naturale sînt populate, de regulă, de comunități complexe de microorganisme, alcătuite din mai multe specii care interacționează.

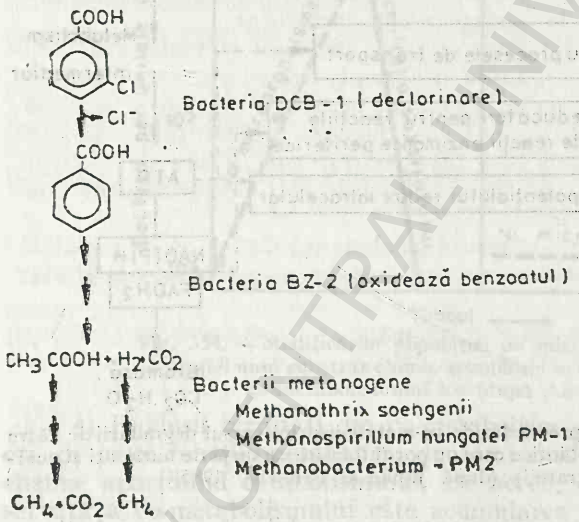



Fig. 356. — Reprezentarea schematică a lanțului trofic de degradare a 3-clorbenzoatului, cu evidențierea bacteriilor care participă în diferitele etape (după Reineke și Knackmuss, 1988).

Speciile individuale avînd diverse activități catabolice acționează sinergic, formînd, în ansamblu, o comunitate fiziologică, cu o activitate metabolică concentrată, neexprimată, niciodată, de populațiile individuale care acționează izolat. În acest sens, mai multe date experimentale demonstrează posibilitatea mineralizării unor substanțe de sinteză — rezistente complet la degradarea de către specii individuale — prin intervenția succesivă a mai multor specii de microorganisme. Această interacțiune este prezentă într-o formă simplă (Daughton și Hsieh, 1977) în cazul bacteriilor *Pseudomonas acruginosa* și *P. stutzerii*, care asociat utilizează pesticidul Parathion ca sursă de C și energie. În această asociație, *P. stutzerii* produce p-nitrofenol, folosit ca nutrient de *P. aeruginosa;* la rîndul său, *P. stutzerii* crește utilizînd produșii rezultați din activitatea bacteriei *P. aeruginosa*.

Figura 356 reprezintă lanțul trofic de degradare a pesticidului 3-clorbenzoat, în care sînt implicate cinci specii bacteriene diferite. Clorul eliberat din ciclul aromatic, prin acțiunea bacteriei DCB-1, este recuperat în

cantități stoichiometrice ca ion, $Cl^-$. Puterea reducătoare necesară pentru declorinarea reductivă este furnizată de oxidarea acetogenă a benzoatului. O treime din hidrogenul disponibil este utilizat în declorinarea reductivă, iar două treimi sînt cedate metanogenilor (Dolfing și Tiedje, 1986; Reineke și Knackmuss, 1988).

Figura 357, prezintă sintetic soarta substanțelor xenobiotice în mediu.

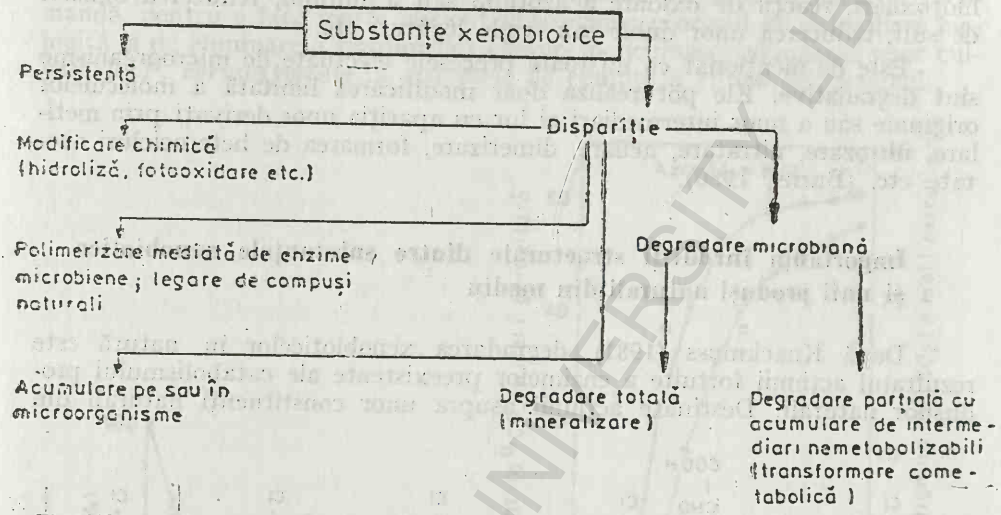



Fig. 357. — Căile de biodegradare, de acumulare și de dispersare a substanțelor xenobiotice în mediu (după Leisinger, 1983).

## Microorganismele active

Experimental s-a demonstrat că, în anumite condiții, aproximativ 50 de genuri de microorganisme — bacterii și microfungi — participă la degradarea substanțelor xenobiotice în natură (în apă și în sol).

Deși datele sînt fragmentare, se poate afirma cu certitudine că *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, unele actinomicete și levuri, precum și unele organisme fitoplanctonice pot realiza metabolizarea anaerobă a DDT la DDD, precum și a altor poluanți (lindan, heptaclor și posibil aldrin). Procesul ar fi mai activ în lacurile bogate în fitoplancton și s-ar realiza, de asemenea, sub acțiunea microorganismelor din mîlul de la fundul lacurilor.

Dintre alge, *Chlorella vulgaris* și *Chlamydomonas reinhardtii* metabolizează activ lindanul, prin declorinare la pentaclor ciclohexan (Sweeney, 1968).

Parationul și pentaclorfenolul sînt rapid degradate în natură de tulpini de microorganisme adaptate natural. Astfel, o tulpină de *Flavobacterium* îndepărtează pentaclorfenolul din lacuri (concentrații pînă la 100 ppm), reducîndu-l la niveluri nedetectabile în 2—3 zile. Aceste tulpini active ar putea fi folosite în tratarea microbiană a apelor uzate.

Dintre bacterii, cele mai active sînt cele din genurile: *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Sarcina*, *Xanthomonas*, *Achromobacterium*, *Agrobacterium* etc.

Dintre microfungi, *Penicillium* și *Aspergillus* sp. atacă diuronul, manuronul, fenuronul (feniluree), cu producere de anilină, $CO_2$ și $NH_3$, iar *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium roseum* și *Trichoderma* sp. degradează triazinele (atrazin, simazin etc.).

*Reacțiile chimice* efectuate sînt complexe și relativ puțin cunoscute. Ele includ: dehalogenări, dezaminări, decarboxilări, metiloxidări, β-oxidări, hidroxilări, reacții de oxidare a azotului sau a sulfului, reducerea oxizilor de sulf, reducerea unor duble sau triple legături etc.

Este de menționat că nu toate procesele efectuate de microorganisme sînt degradative. Ele pot realiza doar modificarea limitată a moleculelor originare sau a unor intermediari ai lor cu apariția unor derivați prin metilare, nitrozare, nitratare, acilare, dimerizare, formarea de heterocicluri azotate etc. (Burns, 1980).

## Importanța înrudirii structurale dintre substanțele xenobiotice și unii produși naturali din mediu

După Knackmuss (1981), degradarea xenobioticelor în natură este rezultatul acțiunii fortuite a enzimelor preexistente ale catabolismului produșilor naturali. Destinate acțiunii asupra unor constituenți naturali din

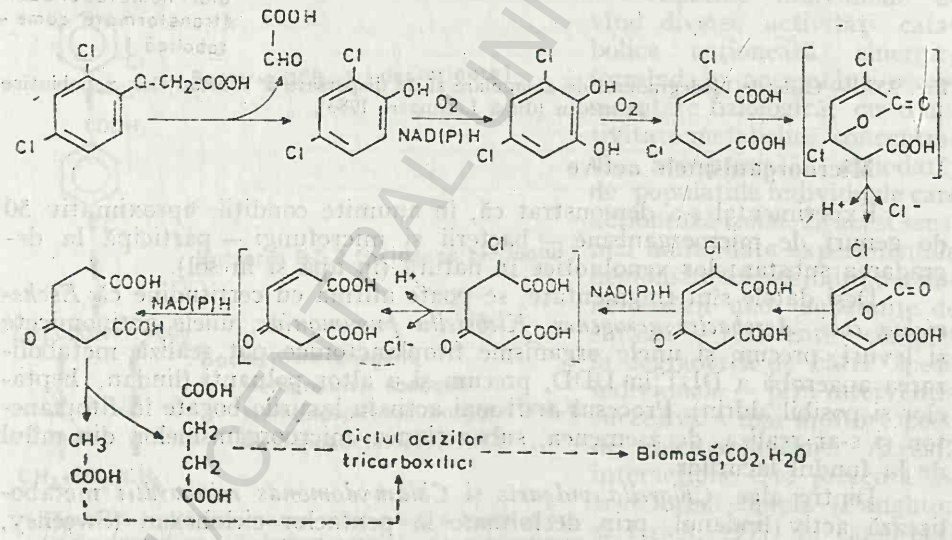



Fig. 358. — Calea metabolică de degradare a pesticidului 2,4-D de către bacteriile aerobe din sol (după Janke și Fritsche, 1985).

mediu, aceste enzime reacționează cu unele grupări funcționale analoge structural din compoziția moleculelor xenobiotice. Spre exemplu, erbicidul sintetic 2,4-D (acid 2,4-diclor-fenoxiacetic) seamănă structural cu o serie de compuși aromatici naturali. Ca urmare, el poate fi degradat în sol de o serie de bacterii aerobe ca: *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium peregrinum*, *Pseudomonas* etc. (fig. 358).

Exemplul cel mai documentat este oferit de Bumpus și colab. (1985). *Phanerochaete chrysosporium* degradează DDT, lindanul și alți produși clorurați la $CO_2$ și $H_2O$ sub acțiunea sistemelor enzimatice extracelulare implicate în mod normal în degradarea ligninei (fig. 359, 360).

Fenomenul este determinat de asemănările structurale dintre aceste substanțe și constituenții polimerului de lignină. Pe această bază, ei recomandă, pentru a face foarte eficient și economic procesul de detoxifiere biologică și de eliminare a reziduurilor chimice periculoase, adăugarea unor culturi de *P. chrysosporium* în sistemele de epurare a efluenților reziduali.

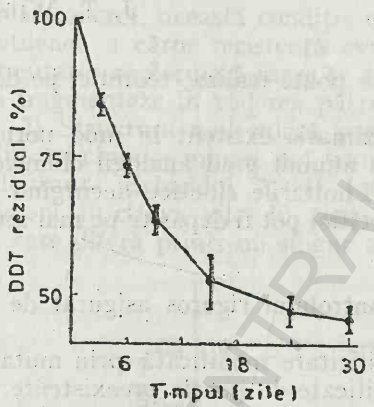



Fig. 359. — Viteza de dispariție prin biodegradare a DDT în prezența unei culturi de *Phanerochaete chrysosporium* (după Bumpus și colab., 1985).

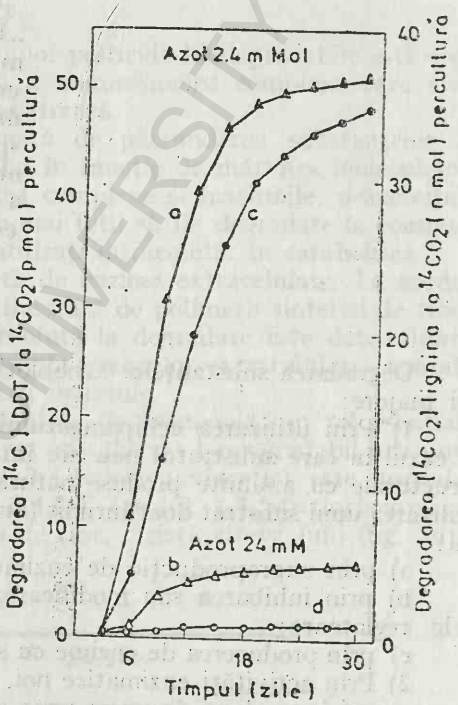



Fig. 360. — Efectul concentrației în nutrienți azotați asupra oxidării ligninei (curbele cu triunghiuri) și a DDT (curbele cu cercuri și puncte negre) sub influența unei culturi de *Phanerochaete chrysosporium* (după Bumpus și colab., 1985).

O altă explicație importantă decurge din studiile experimentale asupra fenomenului de co-metabolism. Horvath (1972) a demonstrat că *Brevibacterium* sp. degradează pesticidul acid 2,3,6-triclorbenzoic la 3,5-diclorcatechol, dacă se adaugă, ca „stimulator" în mediu, acid benzoic. Acesta este biodegradabil și favorizează creșterea bacteriilor care metabolizează erbicidul.

Generalizînd, se poate spune că mediile naturale contaminate cu substanțe recalcitrante (organoclorurate sau de altă natură) pot fi mai ușor detoxificate și epurate dacă li se adaugă un analog structural natural, biodegra-

dabil, care stimulează multiplicarea microorganismelor active. Pe această bază, Horvath (1972) a propus ca aplicarea erbicidelor în ecosistemele naturale să se facă simultan cu o „îmbogățire în analogi" („Analogue enrichment") a mediului respectiv, pentru a asigura grăbirea procesului de îndepărtare a poluanților.

## BAZELE GENETICE ALE DEGRADĂRII COMPUȘILOR ORGANICI HALOGENAȚI

**„Înțelegerea mecanismelor biochimice și genetice de dezasimilare a compușilor organici halogenați biodegradabili reprezintă o etapă logică spre construcția unor tulpini de microorganisme modificate genetic pentru a fi utilizate în viitor în îndepărtarea compușilor cei mai persistenți"**

W. C. Ghiorse
J. T. Wilson

Degradarea substanțelor xenobiotice se poate realiza, teoretic, pe două căi majore:

1) Prin utilizarea echipamentului enzimatic existent în mod normal, în cazul în care substratul nou are într-un anumit grad analogii chimice și structurale cu anumite produse naturale. Limitările cinetice decurgînd din utilizarea unui substrat doar înrudit (nu specific) pot fi depășite pe mai multe căi:

a) prin supraproducție de enzime;

b) prin inhibarea sau modificarea controlului riguros asigurat de genele reglatoare;

c) prin producerea de enzime cu specificitate modificată prin mutație.

2) Prin activități enzimatice noi, codificate de genele preexistente sau de gene noi heterologe, în urma unor rearanjări și recombinări genetice „legitime" sau „nelegitime" și, mai ales, prin aport de gene noi, în special plasmidiale.

Bazele genetice ale degradării substanțelor xenobiotice sînt puțin cunoscute, dar este evident că în cele cîteva cazuri descifrate genele sînt cel mai adesea situate grupat, în structura unor plasmide sau transpozoni, adică într-o formă mai ușor transmisibilă de la un genom la altul, intra- sau intercelular. Datorită în special acestui tip de structură genetică, microorganismele din mediile naturale au dobîndit capacitatea de a degrada numeroși compuși halogenați, în special pe cei cu puțini atomi de halogeni (Ghiorse și colab., 1985).

Tulpinile de microorganisme din mediile naturale (sol, apă etc.) ar fi caracterizate printr-o mare flexibilitate a materialului genetic, care le-ar asigura o adaptabilitate rapidă ca răspuns la variabilitatea substratelor din medii și, decurgînd din aceasta, capacitatea de a sintetiza enzime degradative pentru substanțe neîntîlnite în cursul evoluției lor. Ele s-ar deosebi de

tulpinile bacteriene utilizate curent în studiile de genetică bacteriană *(Escherichia coli, Salmonella typhymurium* etc.), limitate la un habitat unic (intestinul) și, prin aceasta, lipsite de versatilitate catabolică și supuse unor controale foarte riguroase.

Tulpinile saprofite prezente în mediile naturale confruntate permanent cu o gamă largă și diversificată de nutrienți și de condiții de mediu ar reprezenta un potențial de evoluție mai rapidă, care le-ar permite să acționeze asupra unor compuși chimici sintetizați de om, care nu au echivalenți în natură.

### Cauzele rezistenței la degradare

Perspectiva obținerii în viitor a unor pesticide biodegradabile este condiționată de cunoașterea aprofundată a mecanismelor complexe care stau la baza caracterului de moleculă recalcitrantă.

1) Biodegradarea este condiționată de pătrunderea substanțelor în celulele microorganismelor, aceasta fiind în funcție de mărimea moleculelor. Moleculele organice prea mari sau prea complexe și insolubile, neaccesibile ca atare bacteriilor și fungilor, trebuie mai întîi să fie degradate la compuși mai mici, care pot fi internalizați și utilizați intracelular în catabolism.

Degradarea inițială este efectuată de enzime extracelulare. La modul cel mai concret, această condiție este ilustrată de polimerii sintetici de tipul polietilenei, a căror rezistență cvasiabsolută la degradare este determinată de greutatea moleculară mare și de absența enzimelor extracelulare capabile să o fragmenteze în vederea pătrunderii în celule.

2) Structura moleculară pare să aibă, de asemenea, un rol esențial: modificări chimice minore pot transforma un substrat biodegradabil într-unul recalcitrant. Erbicidul 2,4-D (acidul 2,4-diclorfenoxiacetic) este degradabil în sol, în cîteva zile, în timp ce 2,4,5-T (acidul 2,5,5-triclorfenoxiacetic), care diferă printr-un singur atom de clor, rezistă cîteva luni (fig. 361).

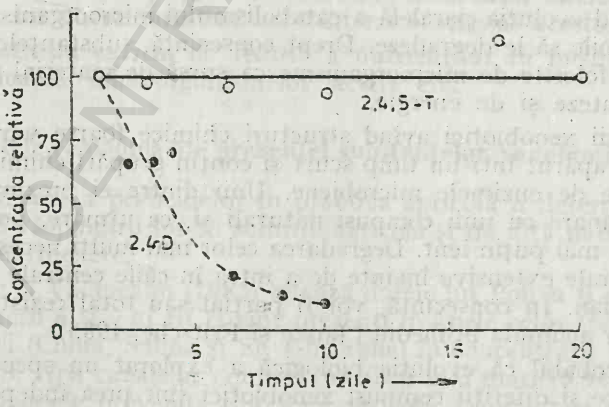



Fig. 361. — Dinamica descompunerii erbicidelor 2,4-D și 2,4,5-T sub acțiunea microorganismelor din sol (după Whiteside și Alexander, 1960).

Polietilena (polimer sintetic cu formula $(CH_2CH_2)_n$ în care $n$ este un număr mare) este refractară la atacul microorganismelor, în timp ce polietilenglicolul $(CH_2CH_2O)_n$ poate fi folosit ca nutrient.

Relația certă dintre structura moleculară și rezistența diferită la biodegradare este ilustrată și de diferența de rezistență la degradare a celulozei și a ligninei. În primul caz, microorganismele acționează prin intermediul celulazelor pentru a cliva în mod repetat același tip de legătură chimică între subunități identice.

Chiar în cazul proteinelor, legăturile peptidice succesive sînt identice, deși leagă aminoacizi diferiți. Situația este total diferită în cazul ligninei și al humusului, care sînt lent mineralizate datorită structurii lor alcătuite din molecule și legături diferite între blocurile de construcție.

Dagley (1975) citează un exemplu de valorificare a cunoștințelor privind relația dintre structura chimică și rezistența la degradare: substituirea atomilor de Cl din poziția para în molecula de DDT cu grupările metoxil (substituent comun al nucleului benzenic în produșii naturali) permite obținerea unui pesticid, *metoxiclor*, foarte ușor degradabil, în comparație cu DDT.

Complexitatea mare a unui heteropolimer, care poate necesita pentru degradare acțiunea concertată a mai multor enzime sau spècii de microorganisme pentru a-l aduce într-o formă degradabilă, prezența unor substituiri neobișnuite cu clor sau alți halogeni, existența unor structuri (de tip fenoli, solvenți etc.) cu efecte negative asupra microorganismelor sau enzimelor lor, grupările ce le conferă o mare toxicitate sînt tot atîtea cauze ce pot conferi unei molecule organice caracterul de recalcitranță.

3) *Absența echipamentului enzimatic necesar pentru biodegradare.* Spre deosebire de biopolimeri, care sînt degradați mai mult sau mai puțin lent de unul sau de mai multe microorganisme, substanțele xenobiotice sînt frecvent refractare la biodegradare din cauza absenței enzimelor active asupra structurii lor.

Una din explicații rezidă în faptul că apariția diferiților polimeri naturali în cursul evoluției a fost lentă, de-a lungul a milioane sau miliarde de ani, permițînd evoluția paralelă a catabolismului microorganismelor și a enzimelor capabile să le degradeze. Drept consecință, substanțele naturale sînt degradate și folosite de microorganisme ca sursă de material de construcție pentru biosinteze și de energie.

Compușii xenobiotici avînd structuri chimice foarte variate și adesea complexe au apărut într-un timp scurt și conțin grupări chimice, în general, nerecunoscute de enzimele microbiene. Unii dintre ei prezintă grade diferite de asemănare cu unii compuși naturali și, ca urmare, pot fi degradați mai mult sau mai puțin lent. Degradarea celor mai mulți necesită însă modificări structurale extensive înainte de a intra în căile centrale ale metabolismului bacterian. În consecință, vor fi parțial sau total rezistente la degradare și se vor acumula în mediu (Janke și Fritsche, 1985).

Este probabil că evoluția biologică a explorat un spectru limitat de căi metabolice și diferiții compuși xenobiotici sînt prea îndepărtați de căile respective pentru a putea fi utilizați ca substrat pentru creștere; deși comunitățile naturale de microorganisme au o mare versatilitate metabolică și un potențial genetic larg, ele nu pot răspunde la marea complexitate și diversitate a substanțelor sintetizate de om. De aceea, este probabil că unii compuși nu asigură creșterea unor microorganisme, nu sînt atacați prin co-metabolism și nu servesc ca bază pentru selecția de noi genotipuri active.

*Incapacitatea poluanților de a induce sinteza enzimelor degradative*

Concentrația foarte mică (ppm, ppb) a unor poluanți în mediu poate afecta profund sensibilitatea lor la biodegradare. În aceste habitate există riscul ca microorganismele capabile să îi degradeze să fie prezente, însă concentrația poluantului să nu fie suficientă pentru a induce enzimele necesare pentru degradare. Pe plan general evolutiv s-a postulat că apariția microorganismelor capabile să degradeze compușii recalcitranți sintetizați de om are loc numai în nișele ecologice în care concentrația lor este suficient de mare pentru a exercita funcția de presiune în selecție.

Rezistența la degradare a unor poluanți organici poate fi determinată de adsorbția lor pe diferite substraturi din sol și sedimente, care le fac indisponibile pentru preluarea de către microorganisme. Frecvent, prin această adsorbție este mascat situsul de legare a enzimei de substrat, fapt care poate transforma o moleculă biodegradabilă în una refractară.

Practic, multe pesticide se pot lega de humus, păstrîndu-și caracterul xenobiotic atunci cînd sînt desprinse de constituenții acestuia, prin degradarea matricei humice înconjurătoare de către unele microorganisme din sol. În aceste condiții, pesticidele, legate de humus, mobilizate de microorganisme pot contamina recolta și diferite organisme care nu au fost niciodată expuse anterior la acțiunea lor.

**Rolul factorilor de mediu.** Unele substanțe sînt biodegradabile în anumite condiții de mediu și rezistente în altele. Deci, caracterul recalcitrant nu este totdeauna intrinsec, ci este uneori determinat de intervenția unor condiții de mediu. Între acestea, Alexander (1977, 1981) citează:

1) absența $O_2$, în cazul substanțelor mineralizate numai în aerobioză;

2) prezența unor factori (acizi organici, toxine, săruri), care împiedică multiplicarea microorganismelor active;

3) efectul combinat al temperaturilor scăzute și al presiunii în adîncul mărilor;

4) sedimentarea compușilor într-un situs inaccesibil microorganismelor sau acoperirea lor cu un substrat care interzice accesul acestora;

5) concentrația extrem de redusă a nutrienților în mediu, care limitează multiplicarea microorganismelor active etc.

## Consecințele ecologice ale prezenței substanțelor xenobiotice în natură

Larga utilizare a pesticidelor în practica agricolă a determinat un caracter global al răspîndirii lor în solurile agricole și de altă natură, în apele interioare și marine etc.

Botnariuc și Vădineanu (1983) citează datele lui Polizu și colab. (1975) după care izomerii $\alpha$ și $\gamma$ ai HCH sînt prezenți în apele celor trei brațe principale ale Deltei (Chilia, Sulina și Sf. Gheorghe) în concentrații variind între 0,38 și 2,52 ppb. Apa canalelor conține cantități mai mari (0,94—4,12 ppb), deoarece adună apele provenite din zone agricole, iar solurile lutonisipoase conțin DDT + HCH în concentrații de 50—122 ppb.

Diferite modalități de răspîndire pot determina apariția unor efecte nocive la distanțe mari de locul de aplicare, cu afectarea unor ecosisteme fragile. DDT a fost găsit în zăpezile din Antarctica și în Sahara, la distanțe mai mari de 6000 km de locul de administrare cel mai apropiat.

**Toxicitatea pentru microorganisme.** Microorganismele au o mare capacitate de absorbție a pesticidelor, în special, din mediile acvatice, deși se găsesc în concentrații foarte mici. Această acțiune este favorizată în special de doi factori:

1) De suprafața mare de contact cu mediul înconjurător, reprezentînd, după Whitaker, Roan și Ware (1972), 9 100 $cm^2$ în cazul unui gram de celule de levuri ($8{,}3 \times 10^9$ celule). Această suprafață este și mai mare în cazul bacteriilor (1 g de celule bacteriene de dimensiunile *Escherichia coli* corespunde la $1{,}8 \times 10^{12}$ celule și respectiv la 56 000 $cm^2$);

2) Cele mai multe pesticide și, în mod particular, insecticidele sînt lipofile și au o mare afinitate pentru fosfolipidele din membranele celulare (caracterul lor lipofil rezultă și din proprietatea de toxice membranare, precum și din capacitatea de acumulare, la organismele evoluate, în țesutul gras).

Multe pesticide afectează activitatea bacteriilor, diminuînd fixarea biologică a azotului, amonificarea și nitrificarea, cu efecte perturbatoare ale circuitului N în mediile respective; inhibă, de asemenea, activitatea fotosintetizantă și celulozoliza. Ele pot inhiba diviziunea celulelor vegetale și diminuă producția primară a ecosistemelor prin acțiunea asupra fotosintezei.

Majoritatea pesticidelor acționează asupra *fitoplanctonului* (producătorii primari) din mediile acvatice, diminuînd capacitatea lor fotosintetică de producere de C organic.

În timpul unei expuneri de 4 ore s-a observat o diminuare cuprinsă între 7% pentru diazinon și malathion, 77% pentru DDT, 85% pentru aldrin și 94% pentru heptaclor. Numai puține pesticide sînt fără efect. DDT afectează negativ fotosinteza chiar cînd este în concentrații foarte mici (0,1 ppm).

Experimental s-a demonstrat efectul de împiedicare a creșterii fitoplanctonului marin (*Protococcus* sp., *Chlorella* sp., *Dunalliela euchlora*, *Placodactylum tricornutum*, *Monochrysis lutheri*) sub influența unor concentrații diferite de pesticide ca, de exemplu, diuron (0,004 ppm), DDT (60 ppm), lindan (9 ppm), dipterex (500 ppm) (Whitaker, Roan și Ware, 1972).

**Toxicitatea asupra zooplanctonului** este, de asemenea, variabilă. Doza limită care blochează dezvoltarea pentru *Daphnia pulex*, după o expunere de 48 de ore, este de 0,4 ppm pentru DDT, 0,9 pentru diazinon, 42 ppm pentru heptaclor, 1400 ppm pentru dieldrin, 3200 ppm pentru 2,4-D și 4 500 ppm pentru fenac. Aceste date demonstrează existența unei anumite selectivități de acțiune.

Efectele negative variate, uneori cu caracter selectiv, se răsfrîng asupra unei game largi de animale nevertebrate și vertebrate, inclusiv asupra omului. Ele au la bază fenomene de toxicitate asupra membranelor, inhibarea unor activități enzimatice specifice etc. Ca manifestări se pot include efecte nocive asupra gonadelor și fertilității unei game largi de organisme, afectarea sistemului nervos central, cu ataxie locomotorie, convulsii și, în unele cazuri, chiar moarte. Unele pot avea efecte teratogene sau chiar oncogene.

În unele cazuri există riscul apariției unor *fenomene de activare* în cursul perioadei de remanență, în sensul apariției unor modificări minore sub acțiunea altor organisme prin care un produs puțin toxic *per se* este convertit la un compus mai toxic și mai rezistent la biodegradare. Fenomenul a fost semnalat prima dată de Jernelöv și Marlin (1975) în cazul Hg anorganic, cu o toxicitate intrinsecă mai mică decît a produșilor săi de metilare (mono-

și dimetilmercur), care, pe lîngă faptul că sînt mai toxici, sînt mai ușor de preluat de organismele acvatice din sedimente. Un fenomen similar a fost semnalat în cazul conversiei 2,4-D, ușor degradabil în cîteva săptămîni, la un produs mult mai rezistent și mai toxic, 2,4,5-T, pentru care nu au fost evidențiate microorganisme active.

Persistența mai îndelungată a pesticidelor în sol poate determina efecte nocive în timp, în cazul în care în anul sau în anii următori administrării lor sînt introduse prin rotație culturi de plante sensibile la erbicide.

**Fenomenul de bioacumulare.** Datorită solubilității lor reduse în mediile acvatice, pesticidele au tendința de a se localiza în interiorul celulelor vii. Ca urmare, microorganismele, fitoplanctonul și plantele macrofite, ca și fauna de toate dimensiunile pot acumula și stoca în celulele și țesuturile lor cantități importante de pesticide, în concentrații inverse față de solubilitatea lor în apă (Code și colab., 1966). În acest sens pledează numeroase date rezultate din observații experimentale și/sau din mediile naturale.

Gregory și colab. (1969) au expus separat timp de 7 zile, la concentrații de DDT și paration de 1 ppm, cianobacteria *Anacystis nidulans*, alga verde *Scenedesmus obliquus*, alga flagelată *Euglena gracilis* și două protozoare ciliate *Paramecium bursaria* și *P. multimicronucleatum*. Au constatat că microorganismele citate conțin, final, concentrații de DDT de 96—964 ori mai mari și de paration de 50—116 ori mai mari decît cele din mediu.

În unele cazuri, procesul de concentrare se realizează foarte rapid: *Agrobacterium tumefaciens* acumulează după patru ore de contact 90% din cantitatea de dieldrin prezent în mediu, iar microfungii 75 și respectiv 60—83% din această cantitate.

*Daphnia magna*, care reprezintă o verigă importantă în lanțul trofic acvatic, concentrează DDT în cantități variind între 16 000—23 000 față de cele existente în medii acvatice.

Procesul de bioacumulare („Biomagnification") este agravat de faptul că, pe lîngă concentrarea pesticidelor în celule, acestea nu sînt nici degradate și nici excretate în cantități semnificative, ci sînt introduse și transmise ca atare în rețeaua trofică. În aceste condiții, procesul de concentrare continuă de-a lungul diferitelor verigi ale lanțului trofic, teoretic cu aproximativ un ordin de mărime pentru fiecare nivel trofic succesiv. Afirmația are la bază observația că din biomasa utilizată la un anumit nivel trofic numai 10—15% este transferată la nivelul trofic superior, restul de 85—90% fiind disipat în cursul activităților metabolice prin respirație. În consecință, la nivelul trofic cel mai înalt (animale carnivore, păsări de pradă, pești mari prădători), poluantul poate fi prezent în țesuturi în concentrații care depășesc de $10^4$ — $10^6$ ori și în cazuri extreme de $2{,}5 \times 10^6$ ori concentrația sa în mediul natural.

Ramade (1976) citează un exemplu concret referitor la bioacumularea DDT, prezent în apă în concentrația de 0,014 ppm. Insecticidul este regăsit în fitoplancton în concentrație de 5 ppm, în zooplancton și în peștii fitofagi de 7—9 ppm, în peștii prădători de 22—221 ppm și în corcodelul vest-american *(Acchmophorus occidentalis)* de 2 500 ppm.

Aceste date ilustrează un principiu general al poluării în sensul că cu cît un organism este mai îndepărtat în piramida trofică (fig. 362) cu atît poluantul este mai concentrat în țesuturile sale. Or, dacă producătorii primari concentrează poluantul în concentrații mai mari decît în mediu și fie-

care nivel trofic succesiv îl concentrează peste nivelul existent în hrana sa, devine evident că un erbivor poate acumula mai mult poluant decît plantele pe care le consumă, iar un carnivor din nivelul trofic cel mai înalt acumulează o cantitate și mai mare. În felul acesta, unele molecule recalcitrante netoxice în concentrațiile existente în natură devin toxice prin acumulare în concentrații mari în țesuturi, determinînd efecte negative grave asupra speciilor situate *la* sau *aproape de* vîrful lanțului trofic.

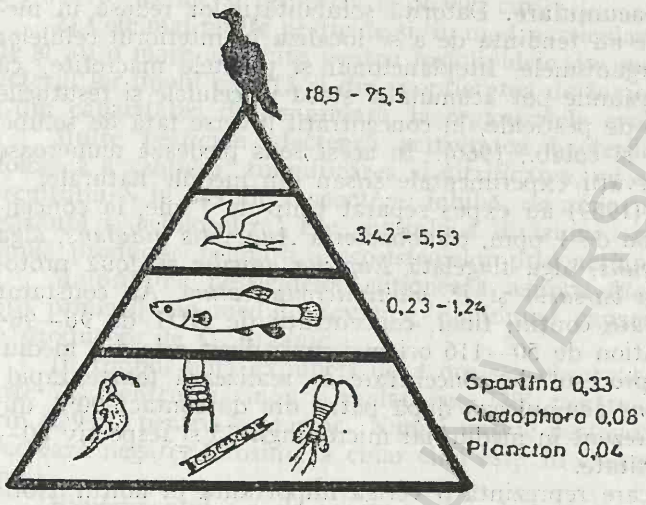



Fig. 362. — Piramida acumulării DDT. Pesticidele rămase în mediu perioade mai îndelungate sînt concentrate în organismele situate la nivele trofice superioare, deoarece acestea nu reușesc să le elimine sau să le degradeze cu viteza cu care sînt acumulate (după Woodwell, Wurster și Isaacon, 1967).

Deși omul este mai puțin expus decît carnivorele acțiunii toxice a acumulării pesticidelor, deoarece își procură hrana din mai multe surse, Ramade (1976) scoate în evidență caracterul larg al acestui fenomen. În anii '60, americanii neexpuși profesional la contactul cu DDT conțineau în grăsimile corporale 12,9 ppm din acest insecticid, francezii 5,2, iar englezii și germanii 2,3 ppm. La locuitorii S.U.A., concentrația DDT era cu 25% mai mică la vegetarieni decît la nevegetarieni.

Fenomenul de bioacumulare are un caracter universal în natură, deoarece la fiecare nivel trofic, în fiecare biocenoză există organisme „concentratoare" care mărește concentrația în țesuturile lor, comparativ cu dozele infime de pesticid din mediu. Restrîngerea biomasei la nivelele trofice superioare este asociată cu acumularea de substanțe recalcitrante.

### Aplicații practice

Biodegradarea și îndepărtarea poluanților recalcitranți, respectiv detoxifierea și mineralizarea lor cu ajutorul microorganismelor reprezintă un factor esențial în atenuarea efectelor lor ecologice și a celor ce vizează sănătatea omului.

Cunoașterea mecanismelor biodegradării produșilor naturali și ale rezistenței substanțelor xenobiotice au permis introducerea în practică a unor procedee menite să se apropie de acest obiectiv prin:

— Producerea de pesticide mai ușor degradabile, prin includerea în structura lor a unor grupări chimice cu echivalente naturale sau introducerea unor modificări care le transformă în substraturi nutritive pentru populațiile de microorganisme din apă și sol.

— Utilizarea unor teste fiabile care să stabilească biodegradabilitatea lor într-un timp rezonabil, precum și lipsa de toxicitate și inocuitatea, în general, înainte de comercializare și aplicarea pe scară mare.

### Construcția unor tulpini bacteriene cu potențial degradativ nou

Pe baza acestor date și a progreselor din genetică și ingineria genetică bacteriană, mai mulți cercetători au încercat să construiască bacterii posedînd căi metabolice hibride, ce evită dezavantajele căilor catabolice neproductive care limitează degradarea substanțelor xenobiotice de către microorganismele sălbatice. În acest scop s-a recurs atît la schimbul de gene natural (prin co-cultivare), cît și la tehnici specifice de inginerie genetică.

Pe baza acestor principii, Knackmuss (1984) a construit tulpini de *Pseudomonas* capabile să degradeze o gamă largă de clorbenzoați și clorfenoli. Adăugate în fluxul unor stații de epurare a apelor industriale, ele și-au dovedit utilitatea, ameliorînd semnificativ coeficientul de îndepărtare a xenobioticelor haloaromatice.

Ghossal și colab. (1985) au obținut prin transfer de plasmide o tulpină de *Pseudomonas cepacia* capabilă să catabolizeze erbicidul 2,4,5-T, deși anterior în mediu nu s-a găsit nici un microorganism capabil să facă această degradare. Introducerea bacteriei reprogramate genetic în solul contaminat cu 2,4,5-T a dus la eliminarea totală a acestuia, solul detoxificat permițînd dezvoltarea plantelor sensibile la erbicid.

Nu se știe dacă schimbul similar de gene are loc și în ecosistemele naturale (sol, lacuri etc.) contaminate cu substanțe organice sintetice și nici dacă transconjugații își exercită capacitățile degradative față de xenobiotice și în prezența compușilor organici normali, ușor utilizabili.

O altă realizare în acest domeniu, datorată lui Hartmann și Knackmuss (1979, 1981), este cea de reunire într-o singură bacterie a două secvențe complementare ale unor căi metabolice implicate în catabolismul compușilor aromatici halogenați, prin rearanjarea informației genetice, utilizînd deci enzime preexistente.

Catabolismul compușilor aromatici și al analogilor lor halogenați depinde, în primul rînd, de acțiunea a două dioxigenaze, care catalizează hidroxilarea substratelor primare, ducînd la formarea de catecholi sau de catecholi substituiți. La multe organisme, specificitatea acestor enzime este suficient de riguroasă pentru a interzice catabolismul anumitor compuși halogenați. În exemplul citat, *Pseudomonas putida* tulpina mt-2 conține o benzoat 1,2-dioxigenază neselectivă (cu specificități mai largi). Cu toate acestea, ea nu poate crește pe mulți benzoați halogenați, datorită specificității riguroase a catechol 1,2-dioxigenazei, care face clivarea ciclului benzenic dependentă de $O_2$ (o enzimă care nu poate metaboliza catecholii substituiți, fig. 363).

Invers, *Pseudomonas* sp., tulpina B 13 are o benzoat 1,2-dioxigenază selectivă (foarte specifică) și o catechol 1,2-dioxigenază neselectivă. Activitatea combinată a celor două tulpini aduce, împreună, cele două en-

zime neselective pentru substrat. Acționînd împreună, ele transformă compușii inaccesibili (2-clorbenzoat, 3,5-diclorbenzoat etc.) în metaboliți intermediari utilizabili. Cultivarea lor continuă în amestec a dus la formarea unei a treia tulpini bacteriene cu capacități catabolice totale.

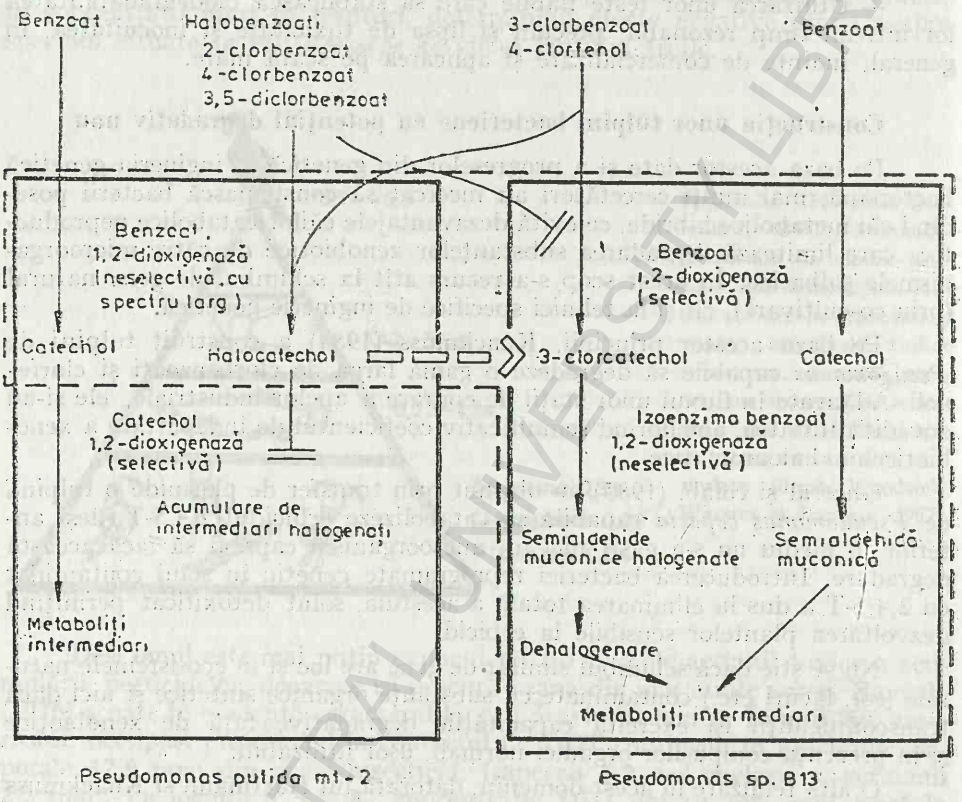



Fig. 363. — Creșterea bacteriei *Pseudomonas putida* tulpina mt-2 și a tulpinii de *Pseudomonas* B 13 pe diferiți acizi benzoici halogenați. Săgeata dublă întreruptă indică transferul de metaboliți dacă cele două tulpini cresc pe 2-clorbenzoat, 4-clorbenzoat și 3,5-diclorbenzoat ca o comunitate sinergică. Liniile continue indică distribuția inițială a enzimelor și, deci, potențialul genetic al celor două bacterii. Liniile întrerupte indică rearanjările genetice teoretic necesare pentru a construi un singur organism capabil să utilizeze halobenzoații ca sursă de carbon și energie în cultură pură; linia dublă (=)blocaj metabolic (după Slater și Bull, 1982).

Transformarea s-a realizat și prin transferul plasmidei p WWO (numită anterior TOL), care codifică benzoat 1,2-dioxigenaza prin conjungare de la *P. putida* mt-2 la *Pseudomonas* sp. B 13.

# MICROBIOLOGIA APELOR REZIDUALE

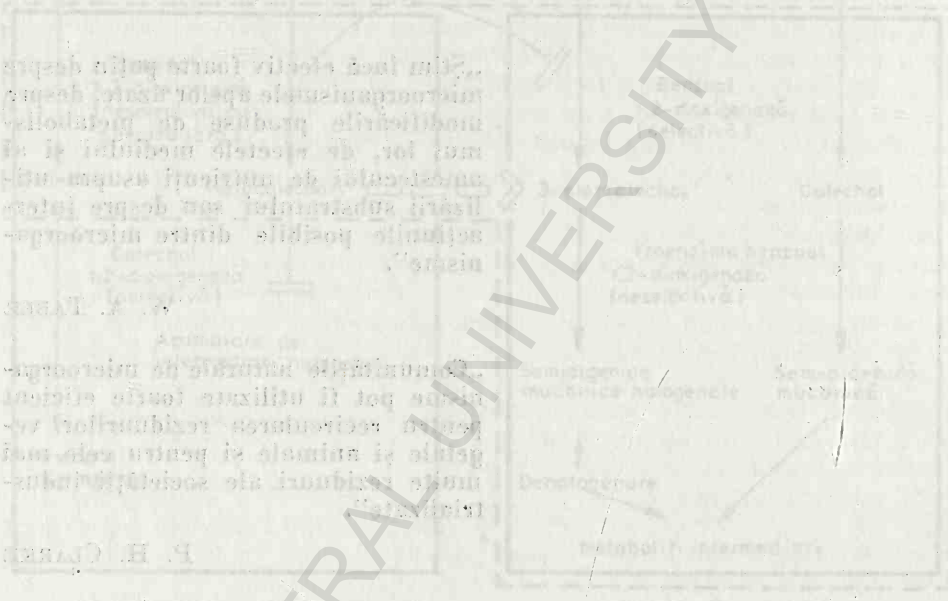
„Știm încă efectiv foarte puțin despre microorganismele apelor uzate, despre modificările produse de metabolismul lor, de efectele mediului și al amestecului de nutrienți asupra utilizării substratului sau despre interacțiunile posibile dintre microorganisme".

W. A. TABER

„Comunitățile naturale de microorganisme pot fi utilizate foarte eficient pentru recircularea reziduurilor vegetale și animale și pentru cele mai multe reziduuri ale societății industrializate".

P. H. CLARKE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

# MICROBIOLOGIA APELOR REZIDUALE

**„Ecologia moleculară a microorganismelor poate furniza instrumente pentru studiul structurii și funcției comunităților de microorganisme biodegradatoare, utile pentru îndepărtarea *in situ* a poluanților mediului".**

R. K. JAIN
G. S. SAYLER

Apele uzate (reziduale) sînt ape evacuate după utilizare, încărcate cu o mare cantitate de reziduuri suspendate sau dizolvate, îndepărtate din locuințe, orașe, întreprinderi industriale, unități agricole sau zootehnice etc. Lăsate să se acumuleze ca atare, substanțele organice sînt expuse degradării cu producere de compuși volatili rău mirositori. Eliminate în diferite bazine acvatice naturale determină perturbări grave de ordin fizico-chimic și exercită efecte nocive asupra florei și faunei naturale. De aceea, din rațiuni de ordin igienico-sanitar, de protecția mediului, economice și de confort evacuarea lor în natură (pe sol sau în ape) nu este posibilă decît după ce au fost făcute inofensive. În acest scop, apele uzate sînt supuse unor procedee de tratare fizice, chimice și biologice a căror complexitate variază nu numai în funcție de proveniența lor, ci, mai ales, de soarta lor finală (reutilizare, evacuare pe sol sau în ape naturale).

## Clasificarea apelor reziduale

**Apele menajere** (fecaloid-menajere) sînt ape folosite care conțin materiale organice de proveniență vegetală sau animală, în stare brută (celuloză, hemiceluloze etc.) sau în diferite grade de descompunere (fecale), urină, ape de spălare, grăsimi, săruri minerale, detergenți și un număr imens de microorganisme diferite, inclusiv agenți patogeni. Gradul de degradare a substanțelor organice este variabil și, în general, corelat cu durata perioadelor de stagnare. Ca stare fizică, substanțele conținute pot fi prezente în soluții, suspensii coloidale, suspensii de particule solide cu dimensiuni mai mari.

Apele orășenești colectează apele menajere și pe cele rezultate din precipitații încărcate cu diferite impurități, cele folosite pentru spălarea străzilor* și frecvent ape uzate industriale (tabelul nr. 71).

**Apele uzate industriale** diferă foarte mult în funcție de proveniență. Unele sînt biodegradabile, cum sînt, în special, cele din industria celulozei și a hîrtiei și mai ales din industria alimentară (fabrici de zahăr, bere, conserve, sucuri, abatoare, industria laptelui). Ele ridică, totuși, probleme speciale de la caz la caz, implicînd participarea în epurare a unor microorganisme caracteristice.

---

* Amploarea poluării orașelor este sugerată de datele lui Feldman (1974), după care în orașul New York, cîinii depun zilnic 68 000 kg fecale și 405 000 l urină, care sînt spălate de apa de ploaie și depuse în apele naturale.

*Tabelul nr. 71*

**Conținutul apelor reziduale orășenești tipice**

(după Schroeder, 1977)

| | Concentrația (mg/l) | | Concentrația (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Total solide: | 700 | Fosfor | ca P 10 |
| Dizolvate: | 500 | | organic 3 |
| din care: Fixate | 300 | | anorganic 7 |
| Volatile | 200 | | |
| Suspendate: | 200 | Grăsimi | 100 |
| din care: Fixate | 50 | Carbon organic total | 200 |
| Volatile | 150 | | |
| Azot | ca N 40 | Consum biochimic de oxigen final | 300 |
| | Organic 15 | | |
| | $NH_3$ liber 25 | Consum chimic de oxigen | 400 |
| | Nitriți 0 | | |
| | Nitrați 0 | | |

Apele nedegradabile (industria cauciucului sintetic, îngrășăminte chimice, petrochimice, în general, siderurgie, metalurgie etc.) conțin uleiuri, hidrocarburi, tiocianați, substanțe aromatice, săruri toxice de Hg, Pb, Cd, As, Cu. Ele sînt tratate prin tehnici complexe nebiologice.

Apele uzate industriale ridică probleme specifice, de aceea amestecul lor cu apele orășenești este de nedorit, deoarece procedeele de epurare sînt incompatibile. Frecvent, apele uzate industriale pot conține substanțe care împiedică dezvoltarea microorganismelor.

**Apele reziduale din zootehnie** includ ape cu mare încărcare organică, frecvent cu substanțe rezistente la degradare (celuloză, hemiceluloze, lignine) și cu specific aparte de epurare. Provin de la creșcătorii de porcine, bovine și păsări.

## MICROBIOTA APELOR UZATE

Din punct de vedere ecologic, apele de canal reprezintă unul din cele mai complexe medii, în care populațiile totale și diferitele grupuri fiziologice sînt expuse la mari fluctuații cantitative și calitative, precum și la interacțiuni dintre cele mai complexe.

Microbiota apelor menajere cel mai mult studiată include un număr mare de bacterii heterotrofe (*Pseudomonas fluorescens, P. aeruginosa, Bacillus cereus, B. subtilis, Enterobacter, Zoogloea, coliformi, Streptococcus faecalis*) și numeroase alte specii care degradează glucidele, proteinele, grăsimile, celuloza etc. Alături de bacterii sînt prezente numeroase levuri (*Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp.) sau similare levurilor („Yeast-like microorganisms"), precum și spori și hife de *Leptomites lacteus* și *Fusarium aquaeductum*.

**Virusuri și microorganisme patogene**

Frecvent, apele uzate pot conține diferiți agenți patogeni pentru om și animale. Sursa majoră de impurificare este reprezentată de materiile fecale ale omului sau animalelor bolnave. Un rol important revine purtătorilor cronici (eliminatori asimptomatici) cu focare infecțioase în splină, ficat, căile biliare sau urinare. După Poole și Hobson (1979), anual, 500 de milioane oameni sînt afectați de boli asociate cu consumul apei infectate. Dintre aceștia, aproximativ 10 milioane mor. Principalii agenți patogeni semnalați sînt :

*Virusuri* : *Poliovirus, Coxsackie, virusul hepatitei.*

*Bacterii* : *Salmonella* sp. (*S. typhi, S. parathyphi*), *Shigella* sp., *Brucella* sp., *Leptospira* sp., *Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, Mycobacterium tuberculosis*, spori de *Bacillus anthracis* și de *Clostridium perfringens, C. novyi, C. septicum.*

*Fungi* : numeroși *Fungi Imperfecti.*

*Protozoare* : *Entamoeba histolytica.*

În general, microorganismele patogene nu se pot dezvolta nici în apele uzate și nici în bazinele naturale (rîuri, lacuri, mări) în care sînt deversate. Ele pot găsi aici doar condiții de supraviețuire temporară cu menținerea virulenței. În această stare, înainte de a fi distruse pot declanșa epidemii hidrice prin consumul apei contaminate, prin scăldat (transcutanat cu *Leptospira* sp.) sau după consumul de alimente infectate neprelucrate termic.

**Tehnicile de tratare a apelor uzate** vizează :

1) mineralizarea materiei organice biodegradabile sub acțiunea microorganismelor și eliminarea potențialului lor de producere a poluării ;

2) inactivarea agenților patogeni (virusuri, bacterii, fungi, protozoare) ;

3) îndepărtarea substanțelor minerale produse prin mineralizare. Evacuate ca atare în bazinele acvatice-receptoare pot stimula creșterea algelor și, ulterior, a altor microorganisme. Această etapă care include procese de denitrificare (pentru îndepărtarea excesului de nitrați) și de defosfatare, ține de treapta terțiară a tratării și este mai rar practicată (Unz și Davis, 1975 ; Taber, 1976) ;

4) reducerea volumului nămolului obținut final și aducerea lui la condiții de stabilitate și inerție biologică.

Unele procedee asigură conversia substanțelor degradate la gaze care se degajă sau sînt colectate și folosite drept combustibil.

**Epurarea biologică,** practicată în stații specializate, reprezintă o etapă a unui demers complex, care implică intrarea în acțiune a unor mecanisme fizice, chimice și biologice (fig. 364).

*Prima etapă* (de tratament preliminar, asigură concentrarea și colectarea materialelor particulate și a celor lichide care sînt tratate separat pentru evitarea supraîncărcării reactorului biologic. În această fază se realizează îndepărtarea prealabilă a materialelor cu dimensiuni mai mari (nisip, pietre, părți metalice etc.), a celor sedimentabile sau flotante (grăsimi, hidrocarburi), utilizînd denisipatoare, grătare, site etc. Totodată este îndepărtată și o mare cantitate de substanțe organice (în cazul apelor menajere 30—40% din CBO , după Adamse, Deinema și Zehnder, 1984).

*Etapa a doua* („tratament secundar"). Apa preluată după tratamentul inițial este expusă, după caz, intervenției unor microorganisme aerobe sau anaerobe, prezente în suspensie sau atașate de diferite substraturi. Biodegradarea materiei organice este favorizată de tendința substanțelor organice solubile sau coloidale de a adera la interfața diferitelor substraturi.

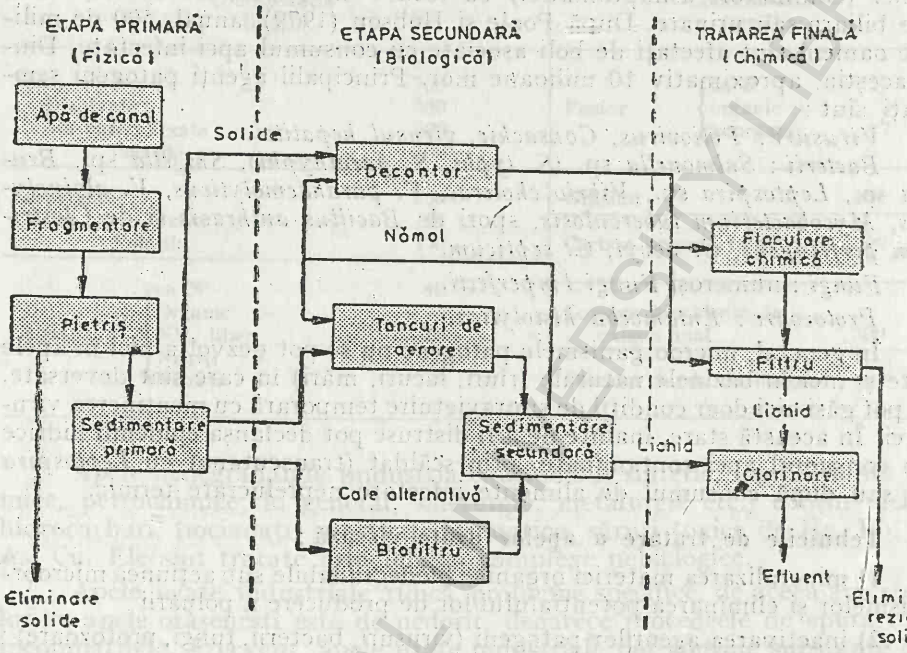



Fig. 364. — Reprezentarea schematică a fluxului și a treptelor majore de epurare într-o stație modernă de tratare a apelor uzate (după Pelczar, 1977).

Practic, diferitele metode de epurare biologică reproduc într-un spațiu restrîns, într-un ritm accelerat de cîteva mii de ori, în condiții pe cît este posibil controlate, fenomene care se produc ca atare și în condiții naturale însă într-un ritm lent (într-un rîu poluat pe un traiect lung de cîteva zeci de km).

*Etapa finală* recurge la procedee chimice (floculare chimică, dezinfecție) și fizice (filtrare), menite să asigure eliberarea fără riscuri a lichidelor și reziduurilor solide în mediu.

În cazul apelor destinate refolosirii ca apă potabilă (spre exemplu, apa folosită în orașul Pitești asigură, după epurare și prin intermediul rîului Argeș, o parte din apa potabilă a orașului București) se recurge la **epurarea avansată.** Aceasta include procedee fizice, chimice și biologice mai mult sau mai puțin complexe (filtrare, coagulări, precipitări, oxidări, denitrificare etc.), care completează efectul de îndepărtare a substanțelor organice, a excesului de N și de P, asigurînd un grad avansat de epurare și condiții optime de securitate pentru consumator.

*Clasificarea metodelor de epurare biologică a apelor uzate.* În funcție de condițiile de mediu (prezența sau absența oxigenului) și de natura microor-

ganismelor active, tehnicile de epurare biologică formează două grupuri distincte.

*Tehnicile acrobe* includ utilizarea filtrelor biologice, a nămolului activat sau a iazurilor biologice de oxidare.

*Tehnicile anaerobe* recurg la degradarea anaerobă (metantancuri) sau la iazurile septice.

## MICROBIOLOGIA TEHNOLOGIILOR DE TRATARE AEROBĂ

### Filtrele biologice

Biofiltrele, filtrele percolatoare sau „picurătoare" (engl. „Tricking filter" = to trickl = a se prelinge, a picura : „Sprinkling filter" = to sprinkle = a stropi, a pulveriza ; „Percolating filter"), utilizează activitatea unei biocenoze complexe și heterogene alcătuită din bacterii, microfungi, alge și protozoare, dezvoltată în cea mai mare parte pe suprafața suporturilor solide din structura filtrului.

În acest scop este utilizat un strat gros de materiale solide, inerte, de preferință rugoase (pietriș, sfărîmături de rocă, zgură, fragmente de material plastic), de diferite dimensiuni, care asigură un raport mare $\frac{\text{suprafață}}{\text{volum}}$.

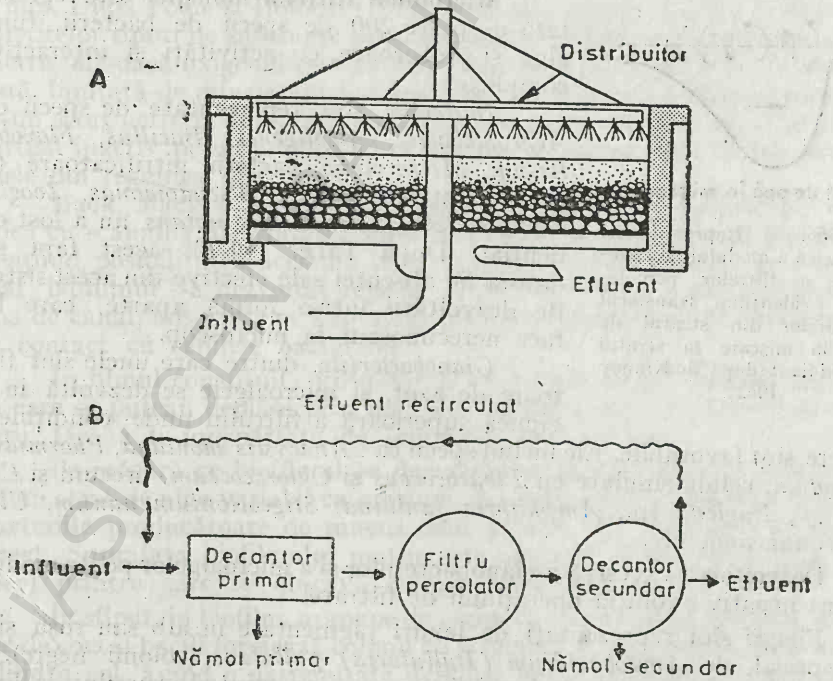



Fig. 365. — Filtrele percolatoare. A. Secțiune transversală printr-un filtru circular cu distribuitor rotativ al apei uzate. B. Reprezentarea schematică a recirculării efluentului prin filtru (după Lacey, 1979).

Pike și Hobson (1971) recomandă ca adecvată pentru apele uzate menajere o coloană înaltă de circa 2 m și cu diametru de 7 m. Materialele utilizate ca suport solid sînt aranjate în așa fel încît să asigure menținerea unor spații între ele, necesare pentru aerarea sistemului (materialele mai grosiere sînt așezate în regiunile mai profunde (fig. 365). Oxigenarea întregului sistem este esențială pentru funcționarea lui eficientă. Aerarea este asigurată *în mod natural*, prin contactul cu atmosfera la suprafața filtrului, prin adăugarea intermitentă a apei reziduale, grație circulației aerului prin spațiile dintre elementele solide componente, sau *artificial* (cu ajutorul aerului introdus sub presiune (aerofiltre) de la baza instalației sau din zonele laterale ale coloanei.

Fig. 366. — Reprezentarea schematică a modului de funcționare a filtrelor percolatoare, evidențiind transferul substanțelor din stratul de lichid în mișcare în stratul de lichid fixat (după Mc Kinney 1962).

Apa poluată care a fost în prealabil supusă unui proces de limpezire (prin îndepărtarea particulelor solide) într-un bazin (decantorul primar) este dispersată printr-un sistem special pe suprafața suporturilor solide. Ea se prelinge lent pe suprafața acestora, venind în contact cu microorganismele care degradează substanțele organice și este colectată într-o rețea de drenuri aflate la baza filtrului (fig. 366).

**Microbiota filtrelor biologice** este reprezentată de peste 200 de specii de bacterii, fungi, alge și protozoare, cu activități și interacțiuni complexe.

*Bacteriile* sînt reprezentate de specii de : *Achromobacter, Alcaligenes, Bacillus, Flavobacterium, Micrococcus,* bacterii nitrificatoare (nitrit- și nitratbacterii), *Pseudomonas, Zoogloea ramigera* etc. *Sphaerotilus natans* nu a fost evidențiat. După Taber (1976), acest fapt s-ar datora fie absenței sale efective din acest sistem, fie dezvoltării într-o formă aparte, care l-ar face nerecunoscut la microscop.

*Cianobacteriile*, dintre care unele sînt fixatoare de azot, și microalgele se dezvoltă în regiunea superioară a filtrului unde condițiile de creștere sînt favorabile. Ele includ specii ca : *Anacystis montana, Phormidium uncinatum*, celule similare cu *Pleurococcus* și *Chlorococcum*, precum și *Chlorella* sp., *Euglena* sp., *Amphithrix janthina, Stigeoclonium nanum, Ulothrix tennuissima* etc.

Dezvoltarea excesivă a cianobacteriilor și a microalgelor poate modifica în sens negativ evoluția operațiunii de filtrare.

*Fungii* sînt reprezentați de levuri pigmentate în alb sau roșu și, în mod special, de *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* (colonii negre). Se adaugă numeroase specii de fungi filamentoși aparținînd grupului de *Fungi Imperfecti*. Taber (1976) citează ca foarte frecvent întîlnite *Fusarium aquaeductum* și *Subbaromyces splendens*.

*Protozoarele* sînt reprezentate de specii ca : *Amoeba verrucosa, Aspidisca costata, Bodo putrinus, Colpidium colpoda, Paramecium caudatum, Vorticella microstoma* etc.

Numărul fungilor și al protozoarelor este influențat de concentrația în nutrienți și de tensiunea oxigenului din faza lichidă.

Instalațiile de filtre percolatoare produc aerosoli încărcați cu fagi, cu alte virusuri și cu bacterii, care pot fi detectați la distanțe de aproximativ 1000 m de amplasamentul lor.

**Arhitectura biofilmului.** În cazul unei instalații noi, formarea și maturarea peliculei biologice, care necesită cîteva săptămîni, trebuie realizată înainte de punerea ei în stare de funcțiune.

Un rol important revine bacteriilor care produc diferite tipuri de polizaharide extracelulare, ce aderă de suprafața pietrelor, determinînd o creștere zoogleală. Pelicula bacteriană mucoidă favorizează aderența altor microorganisme, precum și captarea materiei fin particulate din apele uzate.

Spre deosebire de nămolul activat, care constă dintr-o masă de bacterii, protozoare, substanțe reziduale în suspensie și apă uzată, biofilmul este aderent de suprafața suporturilor solide ale filtrului.

După Hoehn și Day (1973), precum și după Taber (1976), cea mai mare parte din biomasă este ocupată de microfungi și alge. Asemănarea cu masa zoogleală (Unz și Dondero, 1970 ; Pelczar, Reid și Chan, 1977) este considerată ca nepotrivită, biofilmul matur avînd o structură triplu stratificată : stratul extern ar fi format în majoritate de fungi, cel mediu de fungi și alge, iar cel intern din bacterii, fungi și alge. Grosimea lui este de aproximativ 2 mm. După Poole și Hobson (1979), grosimea stratului activ în degradarea diferitelor tipuri de substanțe organice poate fi numai de o fracțiune de milimetru, iar dacă oxigenul este limitat, chiar mai mică. Ea este, în mare măsură, limitată de difuzia nutrienților și a $O_2$. Frecvent, biofilmul constă dintr-un strat activ la suprafața cu lichidul (apa de canal) și un strat inferior, virtual inactiv pe măsură ce nutrienții au fost consumați de microorganismele din regiunea respectivă.

Mack, Mack și Anderson (1975) au urmărit, prin microscopie electronică cu scanning, dezvoltarea unui biofilm pe un suport solid (piatră), evidențiind posibilitatea acestuia de a prezenta forme diferite. În cazul studiat, biofilmul s-a dezvoltat repede, astfel încît după 5 zile particulele din apa de canal, adsorbite pe suprafață încă din primele ore de expunere, erau în contact cu celulele bacteriene.

În filmul constituit, protozoarele erau limitate la straturile inferioare, în care se puteau deplasa prin matricea polizaharidică, hrănindu-se cu bacterii, fără a fi îndepărtate de scurgerea apei poluate.

Pe măsură ce biofilmul se dezvoltă, mucusul bacterian este acoperit de un strat de alge variabil ca grosime, dar discontinuu, datorită faptului că bacteriile producătoare de mucus emit printre ele prelungiri în formă de deget. Suprafața biofilmului matur este acoperit de un strat algal (diatomee) printre care se observă colonii bacteriene.

În sfîrșit, în biofilm, aproape de regiunea superioară a filtrului, un amestec de coci și bacili formează colonii cu structuri caracteristice, cu forma unui cilindru gol, avînd o extremitate deschisă spre suprafața filtrului. Această structură specială asigură contactul unui număr maxim de bacterii cu apa uzată, care poate să pătrundă și să iasă din colonia tubulară, asigurînd un

flux continuu de materie organică (nutrienți). În straturile inferioare, coloniile în formă de tub sînt înlocuite de colonii sferice de bacterii cilindrice.

Biofilmul microbian are spre suprafața filtrului o grosime medie de aproximativ 2 mm, care la adîncimea de 30 cm este redusă la 0,01 — 0,02 mm. Această scădere a masei de microorganisme este, probabil, determinată de lipsa oxigenului în biofiltru (Mack, Mack și Anderson, 1975).

În alte cazuri, pelicula biologică este formată din fungi și alge pe care se dezvoltă secundar bacteriile și protozoarele (Cooke și Hirsch, 1958; Poole și Hobson, 1979). În practică s-a demonstrat că biofilmul microbian se dezvoltă o anumită perioadă de timp, după care se detașează de suportul solid, pentru a se reface din nou. În funcție de condițiile specifice (natura instalației, proprietățile apelor uzate, fluxul acesteia), desprinderea peliculei biologice se poate realiza continuu, la interval de cîteva luni sau în cicluri scurte de formare și detașare la cîteva săptămîni. În apariția acestui fenomen au fost incriminate mai multe cauze: 1) acțiunea apei care se scurge; 2) formarea de gaze în zonele profunde ale biofilmului (în care oxigenul nu are acces) sub acțiunea metabolismului microorganismelor anaerobe; 3) moartea și liza celulelor atașate de suportul solid.

### Mecanismul activității microorganismelor din biofiltre

Substanțele organice particulate, în suspensie coloidală sau dizolvate din apa de canal care se prelinge pe suprafața peliculei biologice, sînt adsorbite pe aceasta.

Unele condiții mecanice locale (fig. 366) favorizează difuzia oxigenului în stratul de apă fixat pe suprafața biofilmului și interschimbul de substanțe organice dintre acesta și apa care percolează lent pe suprafața substratului. Mai precis, cînd cantitatea de materie organică din stratul fixat de lichid este mai mică decît cea din apa supusă epurării, substanțele organice din aceasta sînt transferate în stratul fixat. Invers, cînd substanța organică din stratul de lichid fixat este mai mare, o parte din aceasta trece spre apa care percolează (McKinney, 1962).

Activitățile microorganismelor din biofiltre corespund unei culturi staționare de microorganisme imobilizate pe un suport solid, aprovizionate în mod continuu cu nutrienți aduși prin cantitățile mereu reînnoite de ape poluate ce se preling pe suprafața lor.

Cea mai mare parte din materia organică este degradată de bacterii și de microfungi în zona aerobă, unde o parte din constituenții rezultați sînt utilizați pentru biosinteza de biomasă microbiană, iar alta ca sursă de energie. Bacteriile și alte microorganisme sînt consumate de unele protozoare, iar acestea sînt, la rîndul lor, preluate de rotifere, larve de insecte etc. În felul acesta, în biofiltru se realizează un lanț trofic miniatural (fig. 367), foarte eficient în epurare, pentru că la fiecare treaptă a lanțului, o parte din materia organică este convertită la $CO_2$ prin procese de respirație. Consecința este că prin acest mecanism este eliminată o mare parte din materia organică.

Oxidarea materialului organic în pelicula biologică este însoțită de dezaminarea compușilor organici ai azotului cu producere de $NH_3$, care este convertit de bacteriile nitrificatoare la nitriți și apoi la nitrați. Hidrogenul sulfurat produs prin descompunerea compușilor organici cu S este convertit

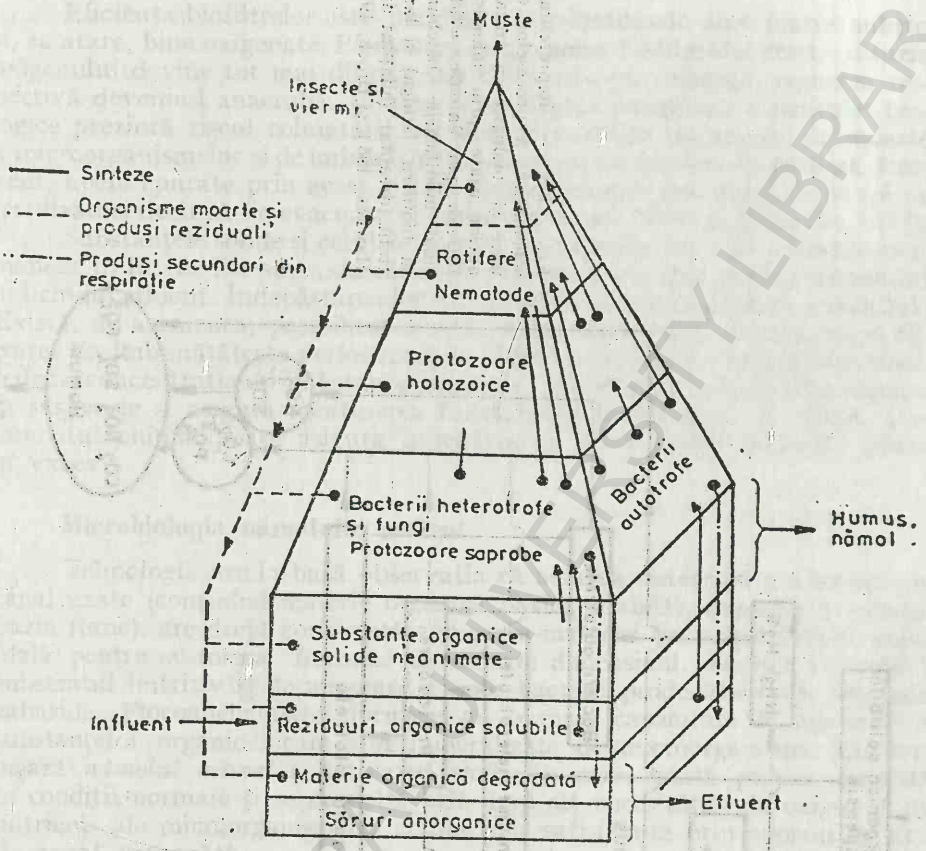



Fig. 367. — Căile majore ale transferului de materie și energie în cursul tratării apelor reziduale cu substanțe organice dizolvate în sistemul de epurare cu biofiltrare. Respirația la fiecare nivel duce la mineralizarea materialelor organice și la eliberarea de energie termică (după Hawkes, 1963).

la $SO_4^{2-}$ de bacteriile chemolitotrofe sulfoxidante. În mod asemănător, fosforul din acizii nucleici și din fosfații organici, în general, este convertit la fosfat anorganic ($PO_4^{3-}$) (fig. 368).

Substanțele anorganice oxidate eliberate în efluent ca atare ($NO_3^-$, $SO_4^{2-}$, $PO_4^{3-}$) sînt nutrienți foarte buni pentru alge. Eliminarea lor ca atare într-un lac sau rîu riscă să determine înfloriri algale și consecutiv acestora, îmbogățirea mediului respectiv în substanțe organice cu consecințele negative cunoscute.

**Eficiența biofiltrelor** este variabilă în funcție de încărcătura organică a apei și de viteza de acțiune. În condiții normale se consideră că, în medie, filtrul percolator asigură îndepărtarea a 85 — 95% particule suspendate și respectiv din $CBO_5$, precum și a 90 — 98% din virusurile prezente inițial în apa de canal.

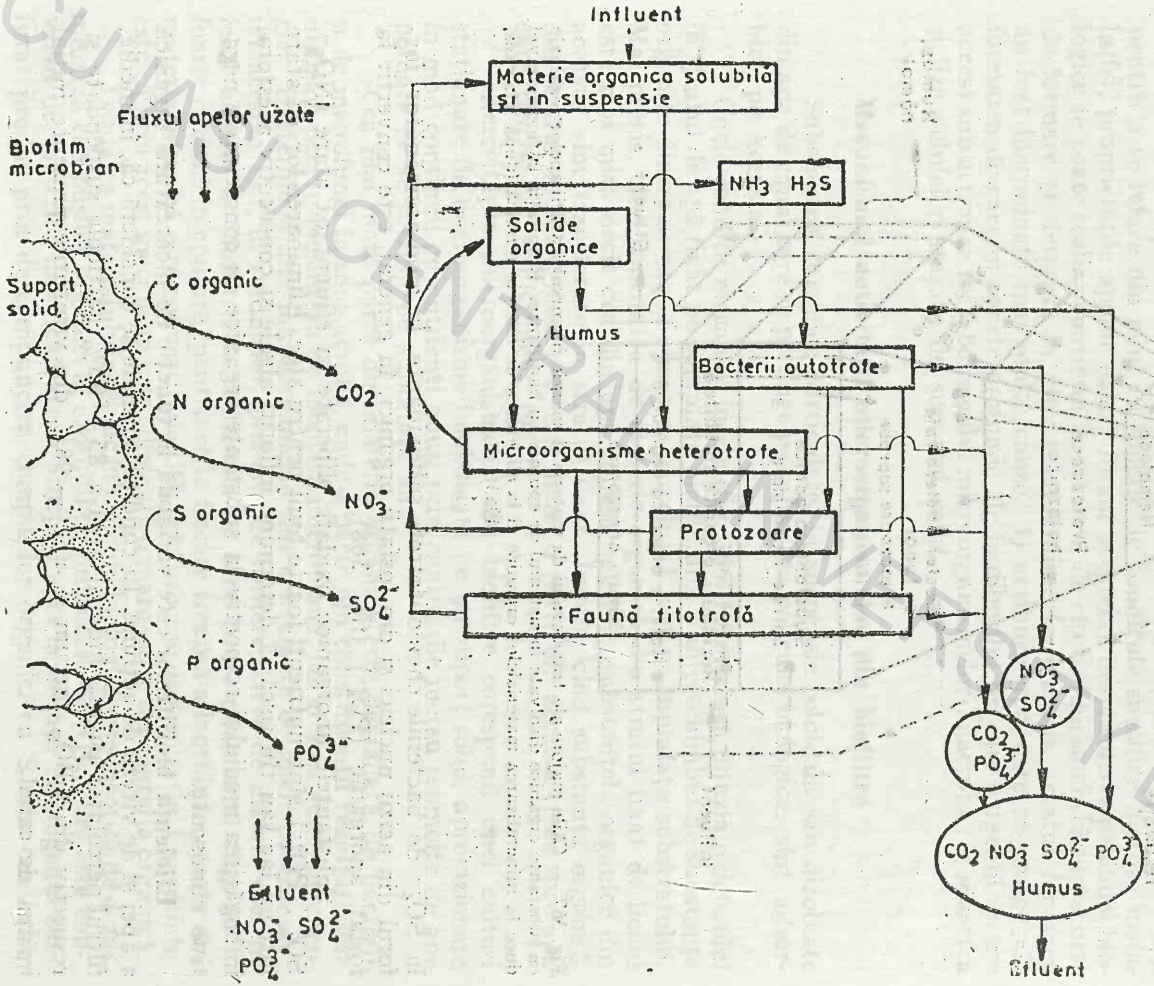



Fig. 368. — Reprezentarea schematică a proceselor chimice și biologice în tratarea apelor uzate prin tehnologia filtrelor percolatoare, evidențiind modificările biochimice în biofiltru (stînga) și lanțul trofic (dreapta) (adaptat după Hawkes, 1961, și Brock, 1974).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Eficiența biofiltrelor este maximă cînd biofilmele sînt foarte subțiri și, ca atare, bine oxigenate. Pe măsură ce grosimea biofilmului crește, difuzia oxigenului devine tot mai dificilă sau chiar este împiedicată, regiunea respectivă devenind anaerobă. În plus, dezvoltarea exagerată a peliculei biologice prezintă riscul colmatării, al blocării spațiilor de aerare, de moarte a microorganismelor și de îmbogățire cu substanțe organice. În prezent, frecvent, apele epurate prin acest sistem sînt răspîndite mai degrabă pe sol ca fertilizatori decît să fie evacuate în emisari naturali (Vela și Euhanks, 1973).

Substanțele solide și celulele microorganismelor nu sînt reținute permanent în filtru. Ele sînt „descărcate" mai mult sau mai puțin intermitent în lichidul efluent. Îndepărtarea lor este posibilă prin sedimentare secundară. Există, de asemenea, posibilitatea recirculării efluentului obținut după filtrare. Ea îmbunătățește performanțele filtrării și calitatea efluentului final, reduce concentrația în substanțe organice, îndepărtează bacteriile rămase în suspensie și asigură menținerea funcționării biofiltrului. În sfîrșit, tratamentul chimic poate asigura îndepărtarea substanțelor minerale aflate în exces.

## Microbiologia nămolului activat

Tehnologia are la bază observația că aerarea puternică a unei ape de canal uzate (conținînd materie organică biodegradabilă), depozitată într-un bazin (tanc), are drept consecință agregarea materiei fin suspendată și coloidală pentru a forma flocoane de diferite dimensiuni. Acestea reprezintă substratul nutritiv și de ancorare a unor bacterii producătoare de exopolizaharide. Flocoanele astfel formate au o mare capacitate de adsorbție a substanțelor organice, care sînt mineralizate de microorganisme. Ele formează *nămolul activat* („Activated sludge"), care, odată produs, persistă în condiții normale și se dezvoltă atît timp cît necesitățile de oxigen și de nutrienți ale microorganismelor aerobe sînt satisfăcute prin aportul de apă de canal proaspătă.

În principiu, procesul seamănă cu biofiltrarea, numai că locul microorganismelor adsorbite pe pietriș, nisip sau alte suporturi solide este luat de particulele de nămol activat suspendate în lichidul de epurat. Funcționrea sistemului implică o etapă inițială, de sedimentare primară, după care apele uzate sînt transferate în tancul de aerare (aerotanc), în care substanțele organice sînt expuse acțiunii de mineralizare a microorganismelor aerobe heterotrofe (fig. 369). Aerarea este menținută la un nivel adecvat prin agitare

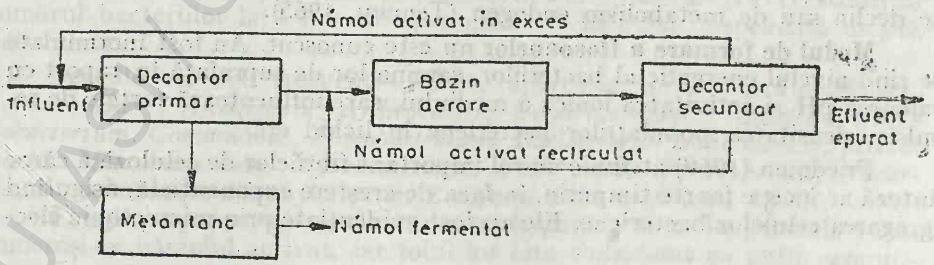



Fig. 369. — Reprezentarea schematică a modului de funcționare a unui sistem de epurare secundară bazat pe nămol activat. O parte din nămol este recirculat ca inoculum pentru apa uzată din influent (după Atlas și Bartha, 1987).

mecanică, prin care noi suprafețe de lichid sînt aduse în contact cu atmosfera din care absorb $O_2$, sau prin introducere de aer sub presiune.

Ambele procedee asigură în același timp menținerea nămolului activ în suspensie. Din motive de ordin economic, rata maximă de transfer a $O_2$ din aer este relativ limitată (0,25 mmoli $O_2$/l/oră și numai în unele cazuri 0,60 mmoli $O_2$/l/oră) *. Aceasta demonstrează că în stațiile de epurare convenționale creșterea și activitatea microorganismelor aerobe, precum și mineralizarea substanțelor organice se realizează la tensiuni moderate de $O_2$ (Poole și Hobson, 1979). După o etapă de decantare secundară este obținut efluentul epurat. O porțiune din nămolul depus, bogat în microorganisme, este reciclat și utilizat pentru inocularea influentului care aduce apă reziduală proaspătă și a tancului de aerare.

Excedentul este tratat pe cale anaerobă. Evacuarea ca atare pe suprafața solului sau deversarea în ape nu este indicată.

**Structura și modul de formare a flocoanelor nămolului activat.** Nămolul activat este format din flocoane descrise și sub denumirea de *mase zoogleale*, prezente fie ca un gel amorf, fie ca un sistem ramificat și din apa reziduală în care acestea sînt suspendate.

Există numeroase controverse privind natura substanțelor chimice care formează matricea flocoanelor, bacteriile care o produc, identitatea diferitelor bacterii din flocon și activitatea lor. Bacteriile vii, care reprezintă 10 — 25% din greutatea flocoanelor, sînt cimentate într-o matrice organică de mucus bacterian. Crabtree și colab. (1966) au demonstrat că flocoanele conțin fie polizaharide legate β-1,4,hidrolizabile de celulaze, fie polimeri de tip acid poli-β-hidroxibutiric. Unele rezultate contradictorii privind compoziția matricei s-ar putea explica prin apariția inițială a acidului poli-β-hidroxibutiric și abia ulterior a polimerilor de tip celulozic (Taber, 1976).

Un rol esențial în formarea flocoanelor a fost atribuit bacteriei *Zoogloea ramigera* (Butterfield, 1935) al cărui statut taxonomic este contestat în prezent de mulți cercetători, în timp ce alții consideră că matricea polizaharidică a flocoanelor este sintetizată de bacteriile convenționale și asociate cu structura lor (Benedict și Carlson, 1971 ; Pike și Curds, 1971).

Floculareа bacteriilor poate fi produsă experimental prin adăugarea în concentrații optime a unor polielectroliți cationici. În consecință, floculareа apărută în stadiile de epurare a apelor uzate ar putea fi produsă de prezența naturală în mediul lichid a unor polielectroliți (acizi humici, acizi poliaminați) sau eliminați la suprafața celulelor bacteriene în cursul fazelor de declin sau de metabolism endogen (Tenney, 1965).

**Modul de formare a flocoanelor** nu este cunoscut. Au fost incriminate pe rînd nivelul energetic al bacteriilor, sarcina lor de suprafață în raport cu valoarea pH și activitatea ionică a mediului, care influențează forțele de repulsie, densitatea populațiilor bacteriene în lichid etc.

Friedman (1969) atribuie un rol important fibrilelor de celuloză a căror sinteză ar începe foarte timpuriu, în faza de creștere exponențială, asigurînd agregarea celulelor bacteriene. Ele au fost evidențiate prin microscopie elec-

* Prin comparație este de menționat că bioreactoarele industriale beneficiază de o rată ridicată de transfer a $O_2$ (30—80 mmoli $O_2$/l/oră, iar cele utilizate pentru producerea de biomasă proteică („Single-cell protein") chiar de mai multe sute de mmoli $O_2$/l/oră.

tronică. Degradarea lor cu ajutorul celulazelor determină destrămarea flocoanelor și trecerea celulelor libere în suspensie (Mulder, Antheunisse și Crombach, 1971).

Într-o încercare de utilizare a diferitelor date pentru a elabora o explicație coerentă a formării flocoanelor, Adamse, Deinema și Zehnder (1984) propun următoarea evoluție : flocularea bacteriilor din nămol începe cînd bacteriile sînt în faza staționară de creștere, adică atunci cînd metabolismul lor este limitat energetic. Agregarea celulelor care se ciocnesc în mediul lichid are loc dacă bacteriile nu dispun de energia necesară pentru a se opune forțelor de atracție care predomină cînd celulele s-au apropiat la o distanță critică, la care forțele de atracție le depășesc pe cele de repulsie.

După ce agregarea a fost inițiată, polielectroliții sintetizați de microorganisme și exopolimerii consolidează flocoanele primare. Ulterior, acestea se leagă unele de altele pentru a forma flocoane mai mari.

Formarea flocoanelor în nămolul activat este esențială pentru funcționarea satisfăcătoare a acestei tehnici de epurare biologică aerobă, deoarece celulele agregate sedimentează mai repede decît cele libere, în suspensie. Or, după cum s-a demonstrat, epurarea nu se poate realiza satisfăcător fără îndepărtarea cît mai masivă a microorganismelor și produselor lor. În aerobioză, aproximativ 50% din materia organică este convertită la $CO_2$, iar restul este fixat în biomasa microorganismelor. În absența sedimentării ele formează o nouă sursă de materie organică și necesită $CBO_5$.

## Microbiota bazinelor cu nămol activat

Reprezintă o comunitate specializată, mai puțin variată decît cea a biofiltrelor, dominată de microorganisme heterotrofe dispersate liber în masa de lichid și mai ales agregate în flocoane. Este formată în special din microorganisme prezente inițial în apa uzată și din această cauză natura speciilor prezente este diferită în funcție de particularitățile microbiene ale sursei.

**Bacteriile.** Numărul bacteriilor este greu de apreciat exact, datorită dificultăților tehnice. În preparatele bine omogenizate, în care s-a asigurat dispersarea agregatelor bacteriene, numărul celulelor este cu 1 — 2 ordine de mărime mai mare decît în apa din care provin. Determinarea numărului de colonii nu permite o apreciere reală, deoarece nu există un mediu de cultură universal care să permită dezvoltarea tuturor speciilor prezente. Foarte multe bacterii sînt muribunde sau moarte. Pike și Curds (1971) estimează numărul bacteriilor la $1{,}4 \times 10^{12}$ per gram de biomasă suspendată uscată (tabelul nr. 72).

Speciile cel mai frecvent întîlnite aparțin genurilor : *Achromobacter*, *Acinetobacter* *, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* *, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Comamonas*, *Flavobacterium*, *Bdellovibrio*, *Lophomonas*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Zoogloea* (Pike și Curds, 1971).

**Fungii**, reprezentați de levuri și mucegaiuri, sînt, în general, puțin numeroși în nămolul activat, iar rolul lor este considerat ca puțin semnificativ.

---

* Genuri cu statut taxonomic infirmat de studiile mai recente.

*Tabelul nr. 72*

**Numărul total și cel al bacteriilor viabile în diferitele stadii de tratare a apelor uzate și în biomasa suspendată** (după Pike și Curds, 1971)

| Surse * | Numărul bacteriilor | | | | % Bacterii viabile |
|---|---|---|---|---|---|
| | În probele de apă (nr/ml | | În biomasă (nr. /g | | |
| | Total | Viabile | Total | Viabile | |
| Apă de canal după sedimentare (22) | $6,8\times 10^8$ | $1,4\times 10^7$ | $3,2\times 10^{12}$ | $6,6\times 10^{10}$ | 2,0 |
| Lichid amestecat cu nămol activat (20) | $6,6\times 10^9$ | $5,6\times 10^7$ | $1,4\times 10^{12}$ | $1,2\times 10^{10}$ | 0,85 |
| Biofilm din filtre percolatoare (18) | $6,2\times 10^{10}$ | $1,5\times 10^9$ | $1,3\times 10^{12}$ | $3,2\times 10^{10}$ | 2,5 |
| Efluenți secundari (10) | $5,2\times 10^7$ | $5,7\times 10^5$ | $4,3\times 10^{12}$ | $4,7\times 10^{10}$ | 1,1 |
| Efluenți terțiari (10) | $3,4\times 10^7$ | $4,1\times 10^4$ | $3,4\times 10^{12}$ | $4,1\times 10^9$ | 0,12 |

* În paranteze, numărul probelor studiate.

Speciile întîlnite cel mai frecvent sînt : *Geotrichum*, *Trichospora* sp., *Cephalosporium*, *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium*, cărora li se adaugă o serie de fungi prădători ca *Zoophagus* sp., *Arthrobotris* sp., *Dactylaria* sp., etc.).

**Algele** sînt fie absente, fie neînsemnate cantitativ, deși se pot dezvolta și heterotrof. Includ specii de *Euglena*, *Peranema*, *Pleuromonas*, *Monadium* ș. a.

În afară de microorganisme, nămolul activat și lichidul în care se găsește conțin o serie de virusuri patogene și bacteriofagi. Prezența fagilor, al căror număr nu este corelat riguros cu cel al bacteriilor-gazdă reprezintă, totuși, un test și o măsură a prezenței acestora. În cazul fagului *E. coli* s-au înregistrat titruri de aproximativ $1,6\times 10^4$/ml (Dhillon și colab., 1970).

**Protozoarele.** Prezente, în general, în număr de aproximativ 50 000 celule/ml, protozoarele reprezintă 5% din „particulele" suspendate în lichid. Ele sînt mai numeroase pe suprafața flocoanelor și a pereților instalațiilor de epurare. Au fost identificate cel puțin 200 de specii (160 de specii de ciliate, 16 flagelate, 25 de specii de amibe, 6 actinopode etc.). Ciliatele predomină nu numai ca specii, ci și ca număr și biomasă. Multe sînt sesile, fiind legate între ele sau pe suprafața flocoanelor, în timp ce altele înoată liber spre masa zoogleică pe suprafața flocoanelor.

Speciile cel mai frecvent întîlnite sînt : *Aspidisca costata*, *Carchesium polypinum*, *Euplotes moebiusi*, *E. charon*, *Opercularia coarctata*, *Tracheophyllum pusillum*, *Vorticella convallaria*, *V. microstoma*, *V. alba*, *V. fromenteli* (fig. 370). Acestora li se adaugă relativ frecvent : *Colpodium colpoda*, *Paramecium caudatum*, *Spirostomum teres* ș. a. Ocazional, amibele și flagelatele pot deveni numeric semnificative. În general, concentrația mare de flagelate indică o supraîncărcare a sistemului cu materie organică.

*Rolul protozoarelor în nămolul activat.* Considerate inițial ca dăunătoare procesului de epurare, protozoarele sînt considerate în prezent ca avînd un rol pozitiv în procesele de tratare aerobă a apelor reziduale. Ele contribuie la formarea flocoanelor și la „sănătatea masei zoogleice" (Pike și Curds, 1971). Fără protozoare, efluenții sînt foarte tulburi (datorită numărului mare de bacterii) și de calitate inferioară.

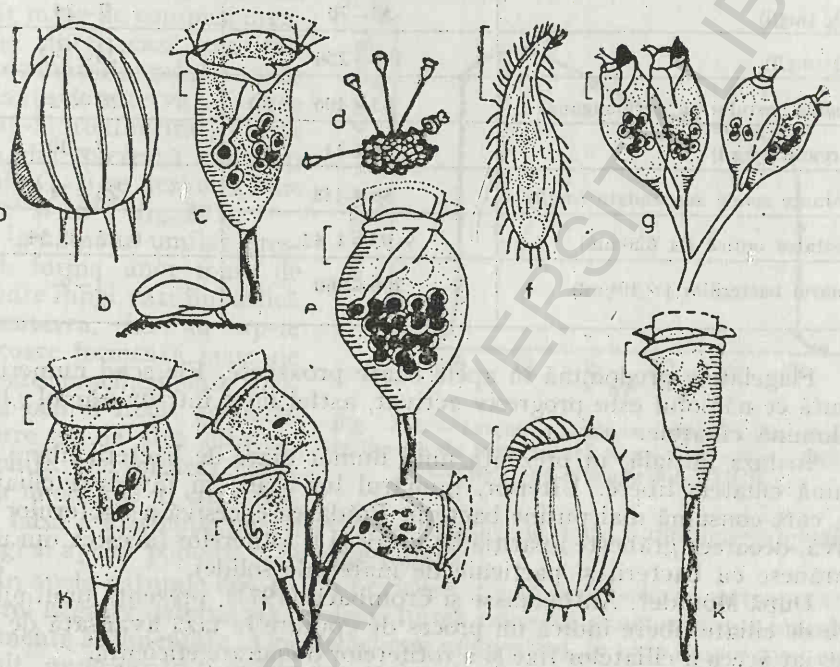



Fig. 370. — Protozoarele cele mai frecvente în nămolul activat. **a.** *Aspidisca costata* (vedere dorsală); **b.** *A. costata* (vedere laterală evidențiind tipul de mobilitate); **c.** *Vorticella convallaria;* **d.** *V. convallaria* atașată de un flocon de nămol; **e.** *V. microstoma;* **f.** *Trachelophyllum pusillum;* **g.** *Opercularia coarctata;* **h.** *Vorticella alba;* **i.** *Carchesium polypinum;* **j.** *Euplotes moebinsi;* **k.** *Vorticella fromenteli.* Scalele adiacente = 10 μm (după Pike și Curds, 1971).

Curds, Cockburn și Vandyke (1968) au produs nămoluri activate lipsite de protozoare și au demonstrat că în absența lor $CBO_5$ rămîne ridicat în efluent, iar conținutul în C organic, substanțe solide suspendate, ca și numărul bacteriilor sînt mai mari decît în nămolul activat „normal" (tabelul nr. 73).

Adăugarea de protozoare nămolurilor respective stimulează producerea de flocoane, probabil datorită mucusului polizaharidic produs de *P. caudatum* și de *Balantiophorus minutus.* Efectul de prădare asupra bacteriilor și alte activități încă nedescifrate explică efectul benefic global al ciliatelor asupra calității efluenților stațiilor de epurare cu nămol activat.

*Protozoarele ca organisme indicatoare ale evoluției epurării.* Curds și Cockburn (1970) au demonstrat că urmărirea evoluției protozoarelor în mediu permite aprecierea condiției nămolului și a mersului procesului de epurare.

*Tabelul nr. 73*

**Efectul protozoarelor ciliate asupra efluentului rezultat în epurarea cu nămol activat**

| Analiza efluentului | Valorile | |
|---|---|---|
| | Fără ciliate | Cu ciliate |
| $CBO_5$ (mg/l) | 53—70 | 7—24 |
| CDO (mg/l) | 198—250 | 124—142 |
| Valoarea testului cu permanganat | 83—106 | 52—72 |
| N organic (mg/l) | 14—21 | 7—10 |
| Substanțe solide suspendate (mg/l) | 86—118 | 26—34 |
| Densitatea optică (la 620 nm) | 9,95—1,42 | 0,23—0,34 |
| Numărul bacteriilor ($\times 10^6$/ml) | 106—160 | 1—9 |

Flagelatele predomină în apele uzate proaspete. Ele scad numeric pe măsură ce nămolul este progresiv activat, astfel încît într-un nămol „bun" predomină ciliatele.

În faza inițială, în prezența unui număr mare de bacterii libere predomină ciliatele libere. Ulterior, numărul lor scade în favoarea ciliatelor fixe, care consumă mai puține bacterii. Prădarea excesivă a bacteriilor este nocivă, deoarece grăbește apariția levurilor și a rotiferelor (acestea din urmă se hrănesc cu bacterii și particule de materiale solide).

După Moulder, Antheunisse și Crombach (1971), prezența unui număr mare de ciliate libere indică un proces de epurare în fază avansată de evoluție, iar aceea a ciliatelor fixe și a rotiferelor o epurare eficientă.

**„Umflarea" nămolului activat.** Evoluția eficientă a proceselor de epurare biologică cu nămol activat este condiționată de creșterea floculantă, care asigură o sedimentare eficientă și un efluent clar, cu $CBO_5$ mult diminuat (Taber, 1976).

Microorganismele pot influența negativ proprietățile nămolului activat, în special prin modificarea proprietăților de sedimentare pe diferite căi :

1) prin producerea de bule de azot gazos ($N_2$), rezultat din procesul de denitrificare, în cazul „nămolului plutitor", care se ridică la suprafața lichidului ;

2) prin dezvoltarea excesivă a microorganismelor anaerobe producătoare de gaze ($CO_2$, $CH_4$, $H_2S$), în cazul nămolului „septic", care stagnează în anumite regiuni ale decantoarelor secundare (Ștefănescu, 1978).

Se adaugă unele perturbări indirecte, care pot determina fragmentarea flocoanelor cum sînt cele rezultate din aerare și agitare excesivă, variații de pH, prezența substanțelor toxice etc.

Condiția perturbatoare cea mai importantă și, în același timp, cel mai mult studiată rezultă din creșterea laxă a microorganismelor, care face nămolul activat mult mai voluminos și nesedimentabil, cunoscută sub denumirea de „umflare" a nămolului („Bulking sludge"). Ea este atribuită, în

mare măsură, creșterii filamentoase a bacteriilor și, în principal, a bacteriei *Sphaerotilus natans*. Aceasta este o bacterie Gram-negativă, cu dimensiuni de 1,2 — 2,4 × 3—10 μm, dispusă în lanțuri, într-o teacă cu grosime uniformă. Celulele izolate, din afara tecii, sînt mobile datorită unui smoc de flageli subpolari, adesea încîlciți, încît dau impresia unui flagel gros mic.

*S. natans* utilizează un număr mare de compuși organici și sintetizează cantități mari de material celular și de substanțe de rezervă (glicogen și poliβ-hidroxibutirat). Crește aerob, dar tolerează cantități mici de $O_2$ și se dezvoltă bine între 5° și 25°C (fig. 371).

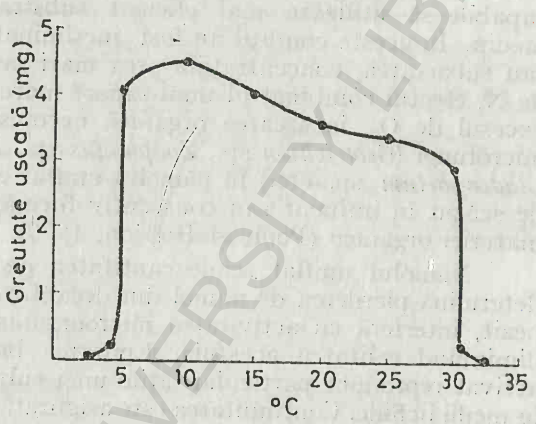



Fig. 371. — Creșterea bacteriei *Sphaerotilus natans* în funcție de temperatură (după Scheuring și Höhnl, modificat de Rheinheimer, 1985).

În nămolul umflat crește sub forma unor mase de filamente lungi, care împiedică sedimentarea, iar în apele curgătoare formează mase de filamente mucilaginoase vizibile cu ochiul liber, ancorate de pietre sau de alte substraturi solide. Dezvoltarea excesivă în unele ape a creat impresia falsă a existenței unei dezvoltări fungice, de unde și denumirea greșită de fungi ai apelor poluate („Sewage-fungus").

În apele naturale are, în mod evident, rol în procesele de autoepurare, dar și rol negativ determinat de dezvoltarea excesivă și acumularea maselor de filamente sedimentate în localizări mai adăpostite, în care cursul apei este încetinit, unde poate fi expus proceselor de descompunere.

Cercetările mai noi au demonstrat complexitatea fenomenelor de umflare a nămolului activat. Fără a infirma rolul bacteriei *S. natans*, ele au evidențiat marea diversitate a comunităților de microorganisme din nămolul activat, incriminînd un spectru mai larg de microorganisme în geneza acestuia. Ea este consecința marii varietăți a nutrienților prezenți în apele menajere, orășenești și industriale, care pot crea condiții pentru dezvoltarea unui număr mare de bacterii unicelulare sau coloniale filamentoase.

**Microbiota nămolului umflat** include, pe lîngă *S. natans*, bacteriile filamentoase : *S. discophorus*, *Streptothrix hyalina*, *Leucothrix* sp. *Beggiatoa* sp., *Nocardia* sp., *Bacillus* sp., *Flavobacterium*, *Flexibacter* sp., și *Microscilla* sp.

Van Veen (1973) semnalează prezența unor bacterii asemănătoare cianobacteriilor și descrise, în consecință, ca genuri și specii noi (neomologate în determinatorul Bergey, 1974), sub denumirea de *Nostocoida limicola* și *Microthrix parvicella*. În sfîrșit, van Veen și colab. (1973) au descris și o nouă bacterie cu rol deosebit de important în fenomenul de umflare a nămolului activ, pe care au denumit-o *Haliscomenobacter hydrossis*. Denumirea sugerează o particularitate structurală caracteristică : bacteria este „închisă"

„într-o teacă hialină apoasă de 0,5 — 0,8 μm (de la gr. „aliskesthai" = a fi închis; epitetul hidrossis este derivat de la gr. „idor" = apă + „Oss" un oraș din Olanda unde a fost izolată („izolat din apa de la Oss").

**Cauzele „umflării"** sînt complexe și încă incomplet elucidate. Indiferent de natura lor favorizează înmulțirea excesivă a formelor filamentoase capabile să utilizeze mai eficient substratul în condiții modificate de mediu. În aceste condiții au fost incriminați și diferiți factori ca: suprasau subaerarea, concentrațiile prea mari sau prea mici de nămol, deficitul de N, efectul combinat al unui raport mare de C/N și de C/P, carența sau excesul de $O_2$, încărcarea organică necorespunzătoare etc. Prezența unor microfungi (*Geotrichum* sp., *Zoophagus* sp., *Leptomitus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium* sp. etc.) în nămolul umflat este o probă a unui pH anormal de scăzut în influent sau consecutiv formării de acizi prin descompunerea materiei organice (Poole și Hobson, 1979).

Nămolul umflat scade cantitatea de nămol activat din aerotanc și determină pierderea de nămol din decantorul secundar prin efluentul limpezit, interferă cu activitatea microorganismelor, cu procesul de epurare, diminuînd calitatea acestuia. Epurarea biologică prin tehnica nămolului activat reproduce particularitățile unei culturi continue de microorganisme în medii lichide. Continuitatea este asigurată, pe de o parte, prin „inocularea" de culturi aerate de microorganisme provenite din influentul nou adăugat și, pe de alta, prin transferul (recircularea) unei părți din nămolul activat. Esențial este ca în condițiile tancurilor de aerare să se mențină creșterea compactă „floculantă", care asigură atît mineralizarea, cît și sedimentarea rapidă a nămolului activat. Un rol esențial în procesul de mineralizare și de epurare revine bacteriilor care acționează cu viteză maximă în faza lor de creștere activă. Procesul este atît de activ încît în absența unui aport continuu de nutrienți ar putea duce la dispariția tuturor microorganismelor. Or, acest fenomen nu se poate realiza datorită intervenției substanțelor organice asociate cu microorganismele din „influent" care restimulează creșterea.

Dezvoltarea logaritmică a bacteriilor este asociată cu dispariția celei mai mari părți din substanțele organice. Procesul de mineralizare oxidativă („Combustia umedă", Tiedman, 1956) este urmat de trecerea bacteriilor în faza de declin a multiplicării. Numărul lor scade, evoluînd spre faza de deficit de substanțe energetice, care favorizează agregarea lor și formarea de noi flocoane. Această situație declanșează o serie de succesiuni în natura și numărul microorganismelor, corelate cu marea lor diversitate metabolică și fiziologică: creșterea temporară a fitoflagelatelor, a rizopodelor (*Sarcodina*), a suctorienilor, a ciliatelor libere, a celor fixate și, final, a rotiferelor (fig. 372).

Metoda nămolului activat este considerată ca deosebit de eficientă și flexibilă, fiind adaptabilă la o gamă largă de concentrații de substanțe organice și la variații de flux ale influentului. Ea asigură reducerea considerabilă a numărului microorganismelor patogene datorită unor mecanisme complexe (sedimentare, adsorbție, competiție, prădare, sub acțiunea bacteriei *Bdellovibrio*, a ciliatelor și a rotiferelor) (tabelul nr. 74). Pe această bază este considerată ca utilă atît pentru apele menajere, cît și pentru cele industriale.

*Tabelul nr. 74*

**Reducerea numărului virionilor și a microorganismelor patogene din apa reziduală după tratarea aerobă** (după Pike, 1975)

| Tehnica | Virusuri | *Escherichia coli* | Coliformi | Streptococi fecali |
|---|---|---|---|---|
| Sedimentare | — | 3—72% | 13—86% | 44—60% |
| Nămol activat | 79—99% | 61—99,7% | 13—83% | 84—92,9% |
| Biofiltre | 40—82% | 73—97% | 15—99,7% | 64—97% |
| Iazuri aerobe | 95,0% | 80—99,5% | 86—99,9% | 87,4—99% |

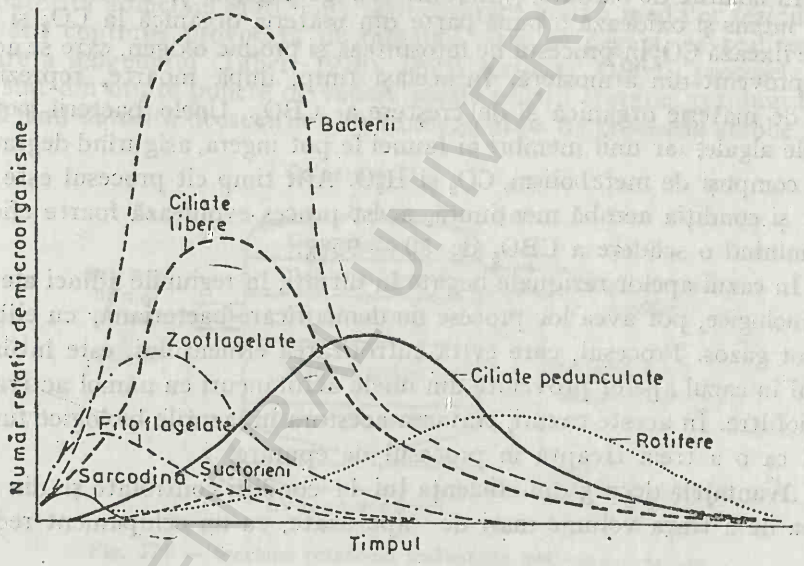



Fig. 372. — Predominanța în timp a diferitelor categorii de microorganisme în sistemele de tratare a apelor uzate organice (după Bungay III și Krieg, 1966).

## Iazurile biologice de stabilizare sau de oxidare

Sînt bazine de mare suprafață, deschise, puțin adînci, naturale sau artificiale, în care se introduc apele reziduale după un tratament primar (sedimentare și limpezire). Reprezintă, deci, a doua treaptă a proceselor de epurare a apelor, bazată pe acțiunea microorganismelor aerobe. Oxigenul este introdus fie prin difuzie din atmosferă, fie prin aerare forțată. În funcție de adîncime, procesul poate fi integral aerob sau, în unele cazuri, aerob la suprafață și anaerob în adîncime.

**Bacteriile** prezente sînt relativ puțin studiate. Cel mai frecvent sînt descrise cele din genurile *Alcaligenes*, *Flavobacterium* și *Pseudomonas*, cărora li se adaugă mai multe bacterii Gram-pozitive și cîteva specii de bacterii Gram-negative (Grann, Collier și Lawrence, 1968). *E. coli*, prezentă frecvent, este îndepărtată foarte lent.

Dintre microfungi, **mucegaiurile** sînt considerate ca avînd o semnificație limitată. Levurile pot fi adesea active. Se consideră că ar putea proveni din sol sau de pe suprafața plantelor.

**Algele.** Datorită luminii solare, microalgele (*Chlorella pyrenoidosa, Vaucheria, Ulothrix, Spirogyra* etc.) se pot dezvolta intens la suprafața lichidului (Taber, 1976).

**Protozoarele** sînt reprezentate de ciliate libere sau fixate pe diferite suporturi solide. Semnificația lor în evoluția proceselor de reglare a populațiilor bacteriene nu este cunoscută.

În iazurile de oxidare, („Aerobic sewage lagoons"), bacteriile se dezvoltă intens și oxidează o bună parte din materia organică la $CO_2$ și $H_2O$. Algele fixează $CO_2$ în procesul de fotosinteză și produc oxigen, care se adaugă celui provenit din atmosferă. În același timp, după moarte, reprezintă o sursă de materie organică și de creștere a $CBO_5$. Unele bacterii pot liza celulele algale, iar unii membri ai faunei le pot ingera, asigurînd degradarea lor la compuși de metabolism, $CO_2$ și $H_2O$. Atît timp cît procesul este echilibrat și condiția aerobă menținută, acest proces evoluează foarte eficient, determinînd o scădere a $CBO_5$ de 80 — 95%.

În cazul apelor reziduale bogate în nitrați, în regiunile adînci ale iazurilor biologice, pot avea loc procese de denitrificare bacteriană, cu eliberare de azot gazos. Procesul, care evită eutrofizarea efluentului, este întîlnit în special în cazul apelor provenite din unele aerotancuri cu nămol activat sau din biofiltre. În aceste cazuri, tratarea acestora în iazurile biologice funcționează ca o a treia treaptă în procesul de epurare.

**Avantajele** decurg din eficiența lui în condiții controlate și din capacitatea de a trata volume mari de ape uzate, cu un echipament redus.

**Dezavantaje**

1) Lumina favorizează dezvoltarea algelor care determină scăderea $CBO_5$ ziua, prin furnizarea de $O_2$, dar inhibă procesul noaptea prin consumarea oxigenului prin respirație. În anumite condiții se recomandă recoltarea sau îndepărtarea algelor prin diferite tehnici fizice sau chimice, deoarece algele moarte reprezintă o sursă de creștere a conținutului în substanțe organice.

2) Iazurile de oxidare funcționează fără posibilități de control al temperaturii. Iarna, procesul de epurare are o evoluție lentă, iar proteinele și detergenții biodegradabili rămîn neatacați.

3) Nu trebuie construite direct pe sol, datorită riscului de percolare a apei reziduale în pînza freatică (Taber, 1976).

# MICROBIOLOGIA TEHNOLOGIILOR DE TRATARE ANAEROBĂ

Degradarea anaerobă este folosită uzual pentru tratarea materialelor care conțin cantități importante de materie organică insolubilă, cum sînt nămolul rezidual de la stațiile de epurare biologică, reziduurile industriale concentrate, materiale cu consistență similară (ca, de exemplu, dejecțiile animale etc.).

Procedeul implică participarea unor comunități complexe de microorganisme, care determină procese de degradare și fermentație prin care materialele organice sînt final convertite la metan și $CO_2$. El se realizează în sistem semicontinuu, în tancuri mari, perfect închise, prevăzute cu dispozitive de colectare a metanului (fig. 373) sau în bazine anaerobe deschise, în care, datorită adîncimii mari, încărcării organice mari a mediilor reziduale și barbotării continue provocată de metanul care se degaja, se realizează o epuizare a oxigenului (Taber, 1976). După McCarty (1964), procesele anaerobe sînt din multe puncte de vedere ideale pentru tratarea reziduurilor, în primul rînd datorită deosebirilor lor fundamentale de procesele aerobe.

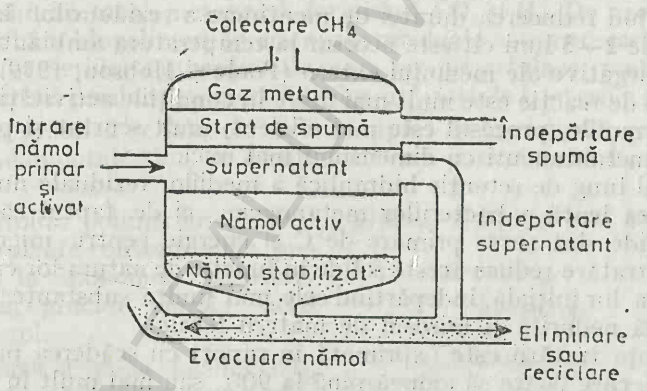



Fig. 373. — Secțiune printr-un metantanc, evidențiind stratificarea conținutului în curentul procesului de metanogeneză (după Wistreich și Lechtman, 1988).

În epurarea biologică aerobă (prin biofiltre sau nămol activat), mediile reziduale sînt amestecate cu cantități mari de microorganisme și de aer. Microorganismele cresc rapid și convertesc o bună parte din reziduurile organice la biomasă microbiană, creînd o altă sursă de materie organică.

În anaerobioză, creșterea lentă asigură conversia celei mai mari părți din substanțele organice la $CO_2$ și $CH_4$, cu producerea unei mici cantități de biomasă. În plus, metanul format este colectat și folosit ca sursă de energie, asigurînd fie autonomia energetică a stației de epurare, fie utilizarea pentru încălzire sau producere de electricitate. Deși $CBO_5$ nu este diminuat în același grad ca în metabolismul aerob, tratarea anaerobă are avantajul că poate fi utilizată în medii cu o încărcare organică de 10 — 20 de ori mai mare decît cele epurate aerob (Taber, 1976). În plus, ea produce o cantitate mică de nămol biologic final, foarte stabilizat și nenociv, cu conținut mic de sub-

stanțe organice, care poate fi ușor sedimentat, uscat și redus la o pulbere inofensivă, relativ inertă la atacul microorganismelor, utilizabilă ca fertilizator.

Bacteriile active (heterotrofe convenționale și metanogene) au nevoie de o aprovizionare adecvată cu surse de N și P, precum și cu diferiți factori de creștere, condiții care sînt realizate constant în cazul apelor uzate orășenești.

Condițiile de pH variază puțin, între 6,6 și 7,6 (pH optim este de 7,0 — — 7,2).

Între factorii perturbatori posibili ai evoluției normale a procesului sînt menționate modificările bruște de temperatură, de încărcare organică sau ale naturii apelor reziduale. De asemenea, ei includ prezența materialelor toxice, scăderea pH sau orice alt factor care încetinește ritmul de dezvoltare a bacteriilor. Anumite modificări ale mediului din digestor reprezintă indicatori importanți ai unui proces de dezechilibru. Ele includ : 1) creșterea concentrației acizilor volatili și/sau a $CO_2$ în compoziția gazelor ; 2) scăderea pH ; 3) scăderea producerii de gaze ; 4) diminuarea gradului de stabilitate a reziduurilor finale.

Dezavantajele (relativ mici în raport cu avantajele) țin de necesitatea asigurării temperaturii de 30 — 37°C în cazul bacteriilor mezofile sau de 50—60°C, al celor termofile. Digestoarele moderne lucrează, în general, la 30°C, asigurînd reducerea duratei de menținere a reziduurilor la 20—30 de zile, în loc de 2—3 luni cît este necesar la temperatura ambiantă, și evitînd influențele negative ale mediului extern (Poole și Hobson, 1979).

Viteza de reacție este mult mai mare în condițiile activității microorganismelor termofile, procesul este mai eficient, mult scurtat și permite utilizarea unor metantancuri cu dimensiuni mai mici.

Timpul lung de retenție hidraulică a mediilor reziduale nu ține numai de activitatea lentă a bacteriilor metanogene, ci de faptul că materialele organice solide sînt surse primare de C și energie pentru microorganisme. Procesul de tratare reduce aceste solide în funcție de natura lor cu peste 60% din greutatea lor inițială, îndepărtînd cele mai multe substanțe care produc o consistență nedorită și mirosul de materii fecale.

Eficiența tratării este exprimată în raport cu scăderea procentuală a $CBO_5$ inițial, care poate să ajungă pînă la 90% sau mai mult în stațiile care funcționează perfect.

Produsul final — biogazul — conține 65 — 70% metan și 30% $CO_2$.

**Comunitățile de microorganisme** prezente sînt complexe și alcătuite în imensa majoritate din bacterii, diferite în funcție de natura materialului rezidual. Numărul lor este de $10^9$ — $10^{10}$ celule/ml. Cele facultativ anaerobe au rolul de a consuma și epuiza cantitățile mici de oxigen prezente în mediu și de a modifica potențialul $E_h$ la un nivel accesibil microorganismelor obligat anaerobe, care, în timp, devin populația predominant activă în digestor. Din punct de vedere fiziologic, ele formează două grupuri distincte (Taber, 1976).

**Microbiota nemetanogenă** include bacteriile : *Actinomyces* sp., *Alcaligenes faecalis*, *A. viscolactis*, *Bacillus* sp., *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Branhamella* (*Neisseria*) *catarrhalis*, *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Desulfovibrio desulfuricans*, *Escherichia coli*, *Eubacterium* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Fusobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Leptospira biflexa*, *Micrococcus* (*Sarcina*) *luteus*, *M. varians*, *Peptococcus* sp., *Pseudomonas reptilivora*, *Rami-*

*bacterium* sp., *Spirillum* sp., *Veillonella, Vibrio* sp. ș.a. Unele dintre aceste specii (*P. reptilivora, A. viscolactis, Ramibacterium* sp.) nu sînt recunoscute în „Bergey's determinative Bacteriology" (1974).

**Microbiota metanogenă** este alcătuită de: *Methanobacterium bryantii, M. thermoautotrophicum, M. formicicum, Methanococcus omelianskii, M. vanniellii, Methanosarcina barkeri, Methanospirillum hungatii, Methanothrix soehngenii, Methanomicrobium mobile, Methanobrevibacter ruminantium.* Aceste bacterii pot utiliza, în funcție de natura lor, diferite combinații de metanol, hidrogen, acetat, formiat și diferiți alți acizi organici (Wolfe, 1970).

Protozoarele, ca și fungii sînt foarte rare și fără activități semnificative.

## Evoluția procesului de degradare anaerobă a reziduurilor

Conversia biologică anaerobă a apelor reziduale încărcate organic la metan este un proces complex, care implică participarea mai multor populații de microorganisme ce interacționează, datorită specificității substratelor pe care le folosesc și produșilor lor individuali. Bacteriile metanogene nu pot converti direct substanțele complexe la metan. Ele folosesc numai o gamă limitată de substraturi ca surse pentru creștere și energie. Cele mai importante sînt acetatul, metanolul, formiatul, $CO_2$ și $H_2$. De aceea, în degradarea anaerobă a biopolimerilor din apele reziduale este necesară activitatea prealabilă a bacteriilor convenționale, care produc celulaze, proteinaze, lipaze etc., asigurînd producerea metaboliților utilizați de bacteriile metanogene.

Deși în practică se folosesc diferite tipuri de digestoare, procesele microbiene fundamentale sînt, în esență, aceleași și evoluează în patru etape succesive:

1) Hidroliza polimerilor (proteine, glucide și lipide) sub acțiunea bacteriilor heterotrofe convenționale (nemetanogene) la monomeri, respectiv la aminoacizi, glucide simple, acizi grași și glicerol.

2) În faza a doua (acidogenă), acești produși sînt degradați prin procese fermentative cu formare de acizi grași volatili inferiori (butiric, propionic, lactic) și de etanol, butanol, propanol, acetonă.

3) În faza acetogenă/hidrogenică, acești produși reduși sînt oxidați anaerob la acetat, formiat, $CO_2$ și $H_2$.

4) $H_2$ astfel produs este greu de detectat, deoarece este rapid și preferențial oxidat de bacteriile metanogene, simultan cu reducerea $CO_2$ la $CH_4$, în faza metanogenă (fig. 374) (Vogel, 1979). Energia este obținută cel puțin în parte din oxidarea $H_2$ care acționează ca reducător.

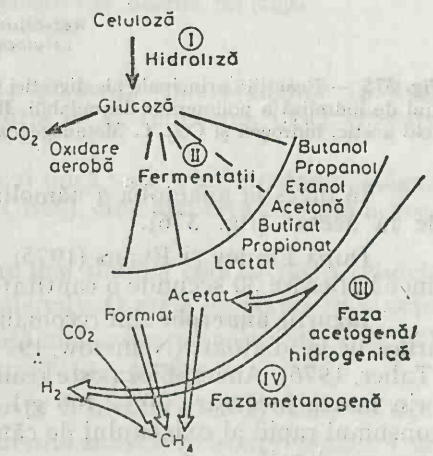



Fig. 374. — Reprezentarea schematică a celor patru faze ale procesului de metanogeneză bacteriană, prin degradarea anaerobă a substanțelor organice (după Vogel, 1979).

Etapa finală, de *fermentație metanică*, este rezultatul a două tipuri de reacții :

a) conversia $CO_2$ și a hidrogenului la metan :

$$4\,H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O \quad (G^\circ = -136)$$

b) Conversia acetatului la metan și $CO_2$ :

$$CH_3COO^- + H^+ + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- + H^+ \quad (G^\circ = -31).$$

Întreaga secvență de reacții poate fi considerată un lanț trofic microbian, în care produsul unei specii este asimilat de un alt grup de microorganisme care acționează succesiv (fig. 375).

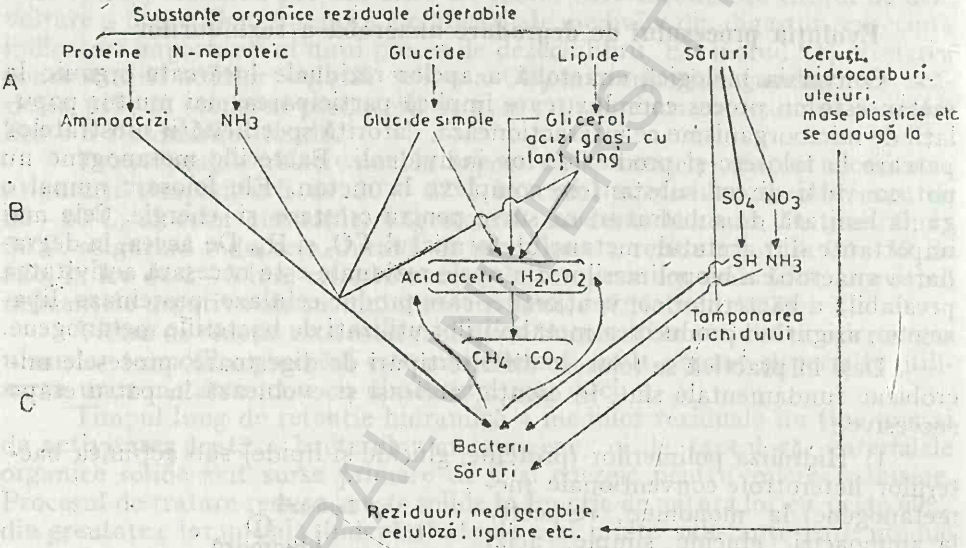



Fig. 375. — Reacțiile principale ale digestiei anaerobe a substanțelor organice reziduale **A.** Stadiul de hidroliză a polimerilor degradabili. **B.** Conversia materialului hidrolizat în principal la acid acetic, hidrogen și $CO_2$. **C.** Metanogeneza produșilor din B (după Poole și Hobson, 1980).

În digestia anaerobă a nămolurilor, metanul este format, în principal, de la acetat (fig. 376).

După Finney și Evans (1975), fiecare bacterie metanogenă poate produce la fiecare 30 secunde o cantitate de metan egală cu volumul ei.

**Iazurile anaerobe** sînt recomandabile pentru reducerea $CBO_5$ al reziduurilor de la abatoare (Nemerow, 1971) sau a celor din industria petrochimică (Taber, 1976). Anaerobioza este realizată, în parte, prin adîncimea bazinelor, prin marea încărcare 20 — 100 g/l cu substanță organică, care favorizează consumul rapid al oxigenului de către microorganisme, ca și de gazul metan care se degajă.

Microbiota include, pe lîngă cea proprie apelor uzate, unele alge (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas* sp., *Euglena* sp., *Carteria* sp. etc.) și, în cazul apelor relativ clare, unele bacterii fotosintetizante anaerobe (*Thiopedia rosea*, *Chromatium* sp. etc.). Atît algele, cît și bacteriile fotosintetizante uti-

lizează nutrienții din apă, dar, în același timp, ele convertesc $CO_2$ la biomasă și, în felul acesta, produc substanță organică nouă. De aceea, dacă nu sînt îndepărtate, ele contribuie la creșterea $CBO_5$. Bacteriile care utilizează $H_2S$ ca donator de hidrogen împiedică emiterea de gaze odorifere.

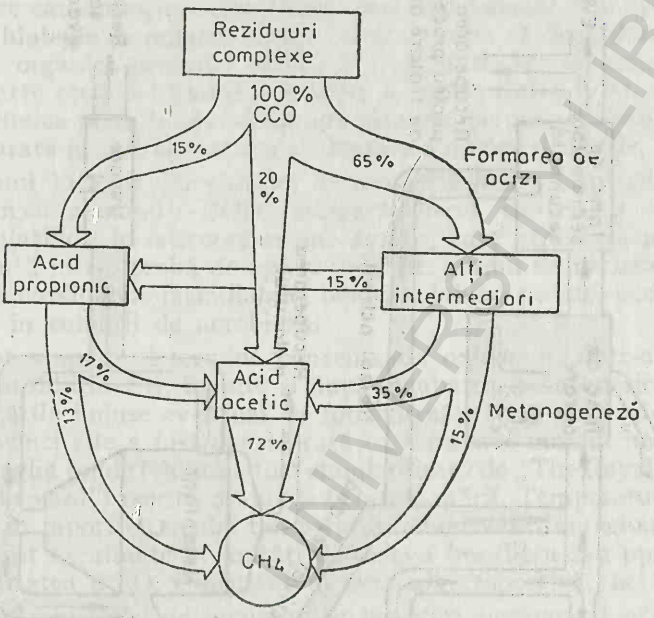



Fig. 376. — Căile de producere a metanului în cursul degradării anaerobe a nămolurilor din apele uzate orășenești. Sînt menționate procentele de conversie a reziduurilor pe diferite căi (după McCarty, 1964).

Microbiota acestor bazine include prezența microfungilor (inclusiv a levurilor) și a protozoarelor. Contribuția lor la reducerea $CBO_5$ este greu de estimat.

Eficiența iazurilor anaerobe este mai mică vara, cînd predomină algele, și maximă iarna (îndepărtează 48% din $CBO_5$), cînd apa este colorată în roșu, datorită bacteriilor fotosintetizante.

Un singur iaz realizează o reducere mai slabă a concentrației celulelor de *Escherichia coli* (de la $10^7$ la $10^6$ celule/ml). O serie de iazuri care acționează timp de 45 de zile pot avea o eficiență mai mare, primele reducînd $CBO_5$, iar ultimele, numărul celulelor de *E. coli* (Taber, 1976).

Evoluția normală a procesului poate fi afectată, în special, în cazul apelor industriale, care sînt poluate cu diferite substanțe toxice (metale grele, antibiotice, medicamente, alte substanțe organice).

Figura 377 prezintă sintetic circulația apei uzate într-un sistem integrat, bazat pe utilizarea principalelor tehnologii de epurare, ce asigură o eficiență maximă.

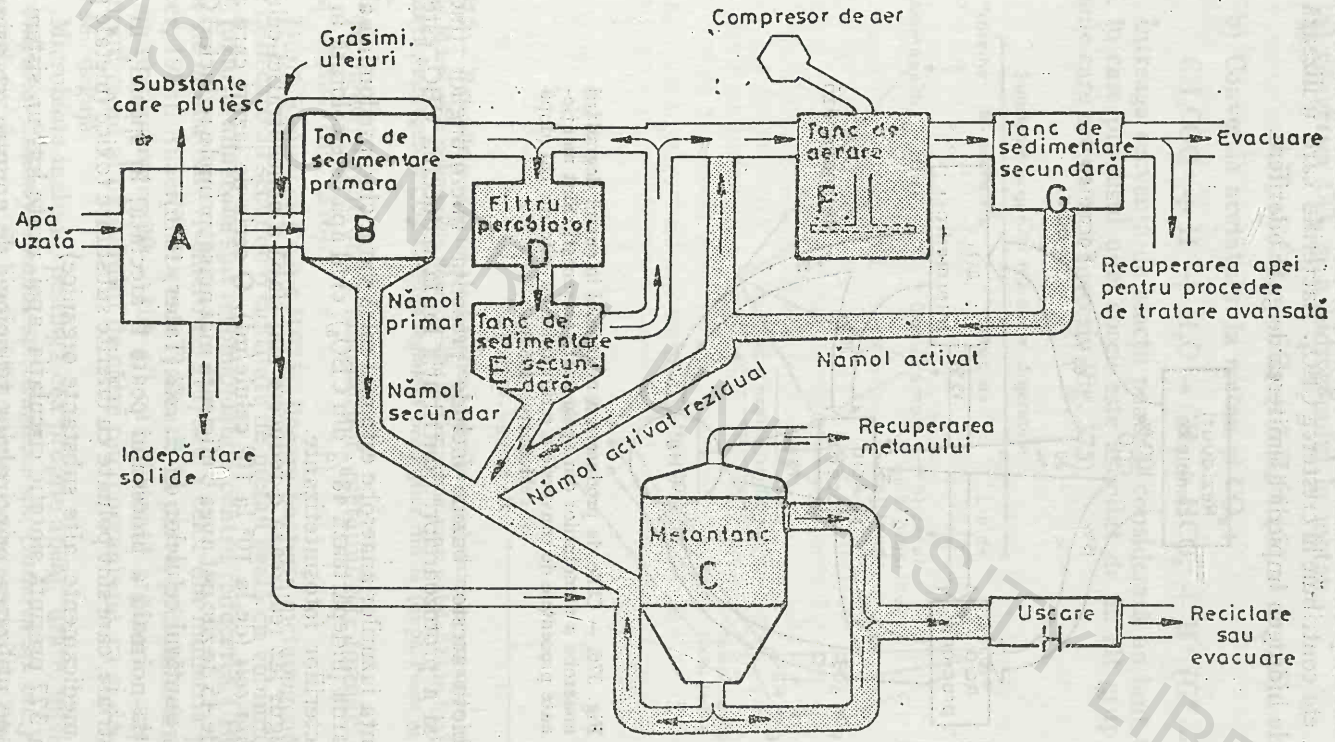



Fig. 377. — Reprezentarea schematică a fluxului apelor reziduale într-un sistem integrat de epurare, bazat pe utilizarea principalelor tehnologii, în desfășurarea cărora microorganismele au un rol esențial (după Wistreich și Lechtman, 1988).

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

## Consumul biochimic (biologic) de oxigen

Aprecierea gradului de diminuare a poluării produse de descărcarea materiei organice în mediul acvatic se poate face utilizînd diferite metode fizice, chimice sau biologice. Una dintre cele mai folosite este determinarea **consumului biologic de oxigen,** bazată pe observația că degradarea diferitelor materiale organice poluante oxidabile (reziduuri, apă de canal, țesuturi vegetale moarte etc.) determină o scădere a conținutului în $O_2$ a mediului respectiv. Tehnica permite aprecierea gradului de poluare și evaluarea stadiului de epurare în cadrul stațiilor de tratare a apelor reziduale.

Consumul biologic (biochimic) de oxigen $CBO_5$ (,,*B*iological, or biochemical *o*xigen *d*emand — BOD) măsoară direct cantitatea de oxigen necesar populațiilor de microorganisme aerobe, care utilizează materia organică prezentă într-o probă de apă și indirect, gradul de încărcare cu substanțe organice oxidabile (asimilabile, biodegradabile) pe care acestea le pot descompune în condiții de aerobioză.

În acest scop, se determină concentrația oxigenului într-o probă de apă sau într-o diluție a ei, înainte și după incubarea în întuneric (pentru a evita modificările induse eventual de fotosinteză), timp de 5 zile, la 20°C. Perioada de cinci zile a fost considerată ca termenul maxim necesar apei rîurilor din Anglia (unde tehnica a fost standardizată de „The Royal Comission on Sewage Disposal") pentru a ajunge în largul mării. Temperatura de 20°C a fost aleasă în raport cu media temperaturilor estivale din regiune (18,3°C). Rezultatele sînt exprimate în unități de oxigen (mg/litru sau ppm) : $CBO_5$ exprimă cantitatea de $O_2$ consumat în perioada respectivă, la 20°C.

În cursul perioadei de incubare se modifică permanent atît cantitatea de materie organică din apă, cît și natura moleculelor componente. Concentrația substanțelor organice scade mult față de debutul determinării. În locul lor apar diferiți produși de metabolism. Are loc o dezvoltare importantă a bacteriilor din mediu (indicele de conversie a substanțelor organice în biomasă este de aproximativ 50%) și ulterior, o creștere temporară a protozoarelor prădătoare și a microorganismelor care pot utiliza produșii rezultați din activitatea bacteriilor (fig. 378).

Testul presupune caracterul reprezentativ al probei, în sensul că procesul determinat *in vitro* evoluează identic cu cel natural. Prezența poluanților toxici (metale grele, cianuri, antibiotice, substanțe chimice de sinteză, medicamente etc.), care inhibă procesele de oxidare, poate duce la interpretări eronate în sensul că proba nu conține substanțe organice.

$CBO_5$ nu măsoară consumul (cerința) de $O_2$ necesar pentru degradarea compușilor biodegradabili mai rezistenți (celuloză, hemiceluloze, lignine etc.). Mineralizarea substanțelor organice are ca rezultat o creștere a concentrației de $NH_3$, utilizat ca sursă de energie și oxidat la nitriți și apoi la nitrați de către bacteriile nitrificatoare, care își intensifică activitatea fazei primare de consum a oxigenului pentru oxidarea substanțelor organice cu C (care teoretic durează pînă la 20 de zile, la 20°C); îi urmează o a doua fază (,,Second stage uptake"), de consum de oxigen „azotat" (,,Nitrogenous oxygen demand"). Această fază, în cursul căreia bacteriile realizează reacțiile: $NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow N_2O_3 \rightarrow N_2O_5$ poate dura 100 de zile și chiar mai mult. În sfîrșit, oxigenul mai poate fi consumat pentru oxidarea $Fe^{2+}$, a sulfurilor și a sulfiților.

Reducerea concentraţiei substanţelor organice asimilabile dizolvate sau suspendate într-o probă de apă uzată este însoţită de o reducere corespunzătoare a $CBO_5$. Pe această bază, testul permite obţinerea unor informaţii extrem de utile asupra evoluţiei procesului de epurare biologică în staţiile de tratare a apelor uzate. De asemenea, permite aprecierea gradului de impurificare şi de evoluţie a proceselor de autoepurare a apelor naturale.

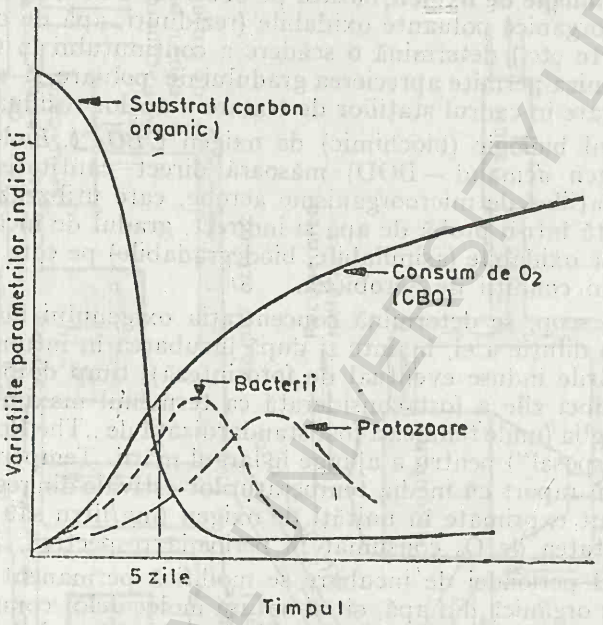



Fig. 378. — Dinamica relaţiei dintre degradarea materiei organice, consumul de oxigen şi creşterea microorganismelor în cursul procesului de epurare a apelor uzate (după Poole şi Hobson, 1979).

**Consumul chimic de oxigen (CCO)** stabileşte indirect cantitatea de oxigen consumat pentru oxidarea tuturor formelor de substanţe organice prezente în mediu (degradabile şi nedegradabile). Efectuat cu ajutorul unor oxidanţi chimici puternici ($MnO_4K$ ş.a.) compensează faptul că $CBO_5$ nu reflectă prezenţa substanţelor rezistente sau recalcitrante la degradarea microorganismelor şi nici cantitatea de biomasă formată. De aceea, CCO este totdeauna mai mare decît $CBO_5$.

Raportul $CBO_5/CCO$ reflectă gradul de biodegradabilitate al unui efluent sau al unei ape reziduale. Pentru apele menajere uzuale, raportul este apropiat de 0,6. Pragul de lipsă de biodegradabilitate este atins cînd $\frac{CBO_5}{CCO} = < 0{,}2$ (Moore, 1974). Tabelul nr. 75 prezintă puterea poluantă a diferitelor reziduuri şi respectiv caracteristicile apelor uzate orăşeneşti tipice.

Evoluţia normală a procesului de epurare a apelor uzate depinde, pe de o parte, de cantitatea de $O_2$ dizolvat disponibil şi de ritmul cu care acesta este preluat din atmosferă şi, pe de alta, de consumul biologic de $O_2$ şi de

*Tabelul nr. 75*

**Puterea poluantă a mai multor tipuri de substanțe reziduale**

(după Poole și Hobson, 1979)

| | |
|---|---|
| Ape de canal menajere | $CBO_5$ : 200—600 mg/l |
| Reziduuri de la prelucrarea diferitelor țesuturi vegetale | $CBO_5$ : 200—5000 mg/l<br>Solide suspendate : 50—1800 mg/l |
| Reziduuri de la abatoare | $CBO_5$ : 1000—4000 mg/l |
| Efluenți de la crescătoriile de porcine | $CBO_5$ : 25 000 mg/l<br>CCO : 100 000 mg/l<br>Total solide : 70 000 mg/l |
| Efluenți de la crescătoriile de bovine | $CBO_5$ : 20 000 mg/l<br>CCO : 100 000 mg/l<br>Total solide : 120 000 mg/l |

viteza cu care acesta are loc. Echilibrul dintre aceste două procese determină dacă bazinul acvatic respectiv poluant rămîne într-o stare acceptabilă, cu o populație biologică normală sau dacă evoluează spre o stare de anaerobioză în care lipsei oxigenului i se adaugă producerea de compuși nocivi rezultați din activitatea microorganismelor. În mod deosebit, reducerea concentrației $O_2$ dizolvat (sub 3—4 ppm) este nocivă pentru pești (cu diferențe de la o specie la alta).

**Desinfecția** reprezintă etapa finală, obligatorie, a tratării apei recirculante în vederea consumării de către populație, avînd rolul de inactivare a virusurilor și de omorîre a bacteriilor enteropatogene care au supraviețuit etapelor anterioare.

*Clorul gazos* ($Cl_2$) reacționează cu apa pentru a produce acid hipocloros, un oxidant foarte puternic, după reacția :

$$Cl_2 + H_2O \longrightarrow HOCl + HCl$$

*Hipocloritul de sodiu* sau *de calciu* reacționează cu apa pentru a forma acid hipocloros, după reacțiile :

$$NaOCl + H_2O \longrightarrow HOCl + NaOH$$

$$Ca(OCl)_2 + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,HOCl + Ca(OH)_2$$

$Cl_2$ și compușii săi de tipul acidului hipocloros și hipocloriților sînt desinfectanți puternici, în special pentru apele curate. Eficiența lor scade în cazul apelor care conțin substanțe organice dizolvate sau suspendate, precum și al celor cu $NH_3$ sau compuși cu Fe redus, Mg și S.

Oxidarea acestora reduce mult acțiunea desinfectantă, deoarece o parte din clor este pierdut datorită reacției cu aceștia. În consecință, în cazul apelor care conțin încă substanțe organice „cererea de clor" este mărită. Clorinarea trebuie făcută în așa fel încît să satisfacă aceste reacții și să asigure un exces de clor rezidual (mai multe mg/l), care rămîne în soluție.

Din datele prezentate, rezultă că nici unul din procedeele de tratare a apelor uzate nu asigură cu certitudine furnizarea unui efluent complet și sigur lipsit de patogeni, deși realizează un grad înalt de purificare (tabelul nr. 76).

*Tabelul nr. 76*

**Numărul bacteriilor (total și viabile) în probe recoltate în diferite stadii de tratare a apelor uzate și în biomasa suspendată** (după Pike și Curds, 1971)

| Proba | Numărul bacteriilor | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | În probe de apă (nr./ml) | | În biomasă (nr./ml) | | % bacterii viabile |
| | Total | Viabile | Total | Viabile | |
| Apă uzată sedimentată | $6,8\times10^{8}$ | $1,4\times10^{7}$ | $3,2\times10^{12}$ | $6,6\times10^{22}$ | 2,0 |
| Nămol activat amestecat cu lichid | $6,6\times10^{9}$ | $5,6\times10^{7}$ | $1,4\times10^{12}$ | $1,2\times10^{10}$ | 0,85 |
| Biofilm de pe filtru | $6,2\times10^{10}$ | $1,5\times10^{9}$ | $1,3\times10^{12}$ | $3,2\times10^{10}$ | 2,5 |
| Efluent secundar | $5,2\times10^{7}$ | $5,7\times10^{5}$ | $4,3\times10^{12}$ | $4,7\times10^{10}$ | 1,1 |
| Efluent terțiar | $3,4\times10^{7}$ | $4,1\times10^{4}$ | $3,4\times10^{12}$ | $4,1\times10^{29}$ | 0,12 |

În cazul virusurilor, chiar sedimentarea primară asigură îndepărtarea unui număr mare de virioni, deoarece cei mai mulți sînt fixați sau adsorbiți pe materialele solide. De aceea, gradul de eliminare este corelat direct cu cantitatea de materiale solide sedimentate. Utilizarea tehnicii nămolurilor activate reprezintă cea mai bună cale de îndepărtare a virionilor (Berg, 1973). Tehnicile de coagulare cu ajutorul ionilor metalici reprezintă, după datele de laborator, metoda de tratament unic cea mai eficace pentru îndepărtarea virionilor. Filtrarea rapidă prin nisip nu elimină virionii, spre deosebire de filtrarea efluenților „coagulați" a cărora mare eficacitate este asigurată de faptul că flocoanele pe cale de formare adsorb numeroși virioni.

**Microorganisme indicatoare ale poluării.** Deoarece agenții patogeni sînt mai greu de izolat și ridică probleme legate de diversitatea lor, în practică se recurge la o probă indirectă de evidențiere a unor bacterii intestinale „indicatoare" a căror prezență semnalează riscul contaminării fecale și implicit al microorganismelor patogene.

Un microorganism indicator ideal ar trebui să îndeplinească următoarele condiții:

1) să fie asociat în mod constant cu patogenii intestinali;
2) să fie ușor de detectat;
3) să fie mai numeroși decît patogenii;
4) să supraviețuiască mai mult în mediul acvatic decît aceștia.

Întrucît nu există un indicator ideal, pentru aprecierea gradului de puritate a apei s-a recurs, după caz, la evidențierea a trei specii bacteriene, cu proprietăți în parte complementare:

*Coliformii* sînt reprezentați de bacterii aparținînd genurilor: *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter* (*Aerobacter*) și *Klebsiella*, avînd ca habitat

primar intestinul omului și al animalelor. În general, sînt slab competitori în mediile oligotrofe (caracteristice bazinelor acvatice naturale) din care sînt eliminați prin competiție și prădare. Supraviețuirea lor mai îndelungată este favorizată de temperatura scăzută, de adsorbția pe sedimente și de condițiile anoxice.

*Streptococii fecali*, respectiv bacteriile *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *S. bovis* și *S. equinus* indică, prin prezența lor în bazinele acvatice, o contaminare recentă.

*Clostridium* (*Welchia*) *perfringens* reprezintă semnul unei contaminări mai vechi (în special dacă streptococii fecali și coliformii au dispărut) sau intermitente. Persistă sub formă de spori perioade îndelungate în apele contaminate.

**Criterii bacteriologice de apreciere a apei potabile.** Pe baza studiilor de epurare a apelor și a datelor epidemiologice au fost stabilite o serie de standarde privind aprecierea caracterului potabil al apei.

După cele mai sigure, apa de băut nu trebuie să conțină nici o bacterie patogenă (respectiv, ca indicator nici un coliform și nici o celulă de *E. coli* în 100 ml apă). Unii cercetători sînt mai toleranți, recurgînd la ideea de *limite statistice tolerabile* și admit pentru apa de oraș o celulă de coliformi la 100 ml. Argumentul de bază este că bacteriile enteropatogene sînt mai puțin numeroase decît *E. coli* și că o singură celulă sau cîteva bacterii patogene nu pot depăși forțele de apărare ale organismului (doza infectantă este de cîteva sute pînă la cîteva mii de celule). Pe bază de practică, Olson și Nagy (1984), citați de Atlas și Bartha (1985), menționează că utilizarea îndelungată a unei ape potabile cu un coliform per 100 ml nu a produs niciodată boala.

Criterii similare sînt aplicate și altor tipuri de ape ca bazinele de înot (1000 coliformi/100 ml) (Rheinheimer, 1979).

## ÎNDEPĂRTAREA COMPUȘILOR AZOTULUI PRIN NITRIFICARE ȘI DENITRIFICARE BACTERIANĂ

Materia organică din apele uzate conține, pe lîngă cantități importante de carbon, și diferiți compuși ai N, S, P, H și O, caracteristici pentru fiecare fază a ciclului de epurare. Pe măsură ce cantitatea de C și N organic scade, acești compuși sînt diferiți în funcție de procesul de tratare utilizat. Acest fenomen este cel mai bine reflectat de natura produșilor finali rezultați. În procedeele aerobe predomină produșii finali oxidați (nitrați, sulfați etc.), iar în cele anaerobe se formează în special $NH_3$, metan și sulfuri (fig. 379 și 380). Compușii azotului (în special nitrații) rezultați după epurarea apelor uzate orășenești, industriale sau din zootehnie pot fi dăunători pentru calitatea apelor receptoare ale efluenților stațiilor de epurare. Ei pot acționa în apele naturale ca „fertilizatori" care stimulează creșterea algelor și a altor plante acvatice, determinînd o accelerare a eutrofizării. McCarty și Hang (1971) insistă și asupra nocivității compușilor reduși, cu efecte adverse asupra resurselor de $O_2$ dizolvat din apele receptoare, care sînt consumate prin procesele de nitrificare.

Ideea eliminării compușilor anorganici excedentari, în special ai N și P, este relativ recentă (Keeney și colab., 1961) și se practică relativ rar, ca parte a tratamentului terțiar (Unz și Davis, 1975). Este însă cert că minera-

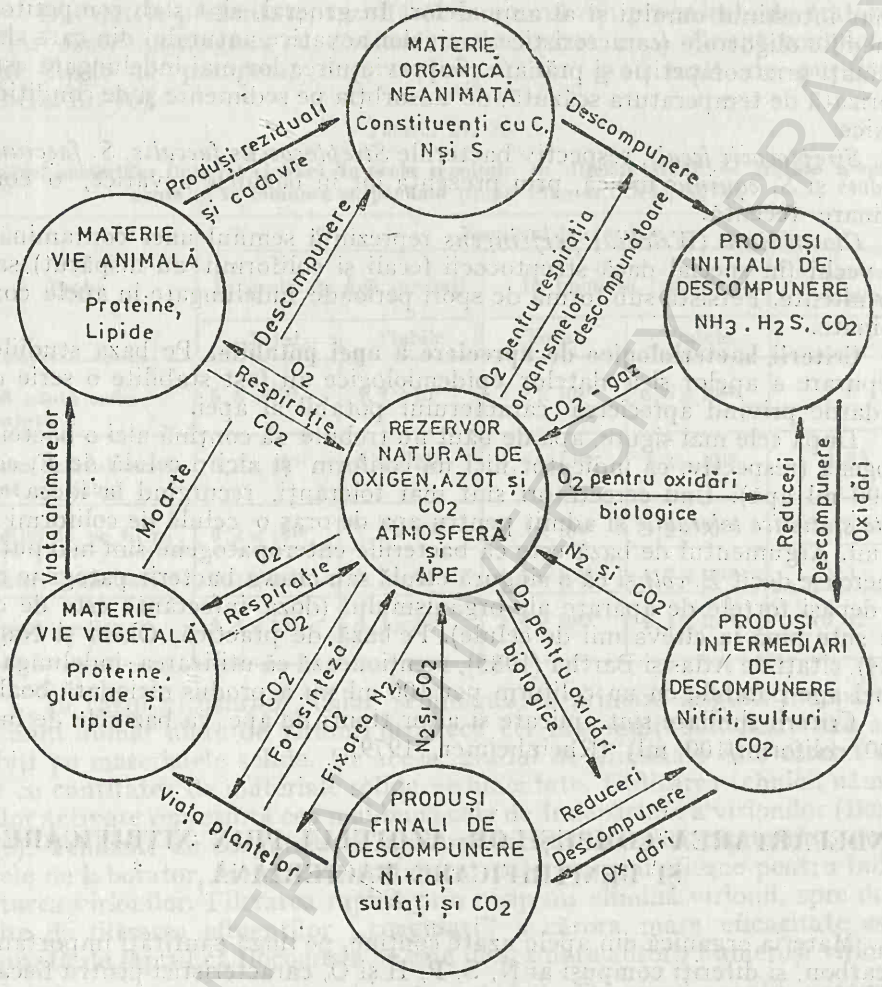



Fig. 379. — Ciclul carbonului, al azotului și al sulfului în cursul tratării aerobe a apelor uzate (după Moore, 1956).

lizarea substanțelor organice în cursul proceselor de epurare fără îndepărtarea mineralelor prezintă riscul de eutrofizare a apelor naturale utilizate ca receptor, prin creșterea bruscă și uneori masivă a concentrației nutrienților anorganici.

Nitrificarea și denitrificarea bacteriană sînt considerate drept cele mai promițătoare metode biologice de îndepărtare a azotului, datorită potențialului înalt de eficiență, costului moderat și necesităților relativ reduse de teren necesar.

În timp ce compușii organici ai N, P, S etc. sînt îndepărtați prin sedimentare, precipitare chimică și biodegradare realizată de microorganisme, pentru compușii anorganici se recurge la tehnici ce reproduc mecanisme de conversie realizate și în condiții naturale.

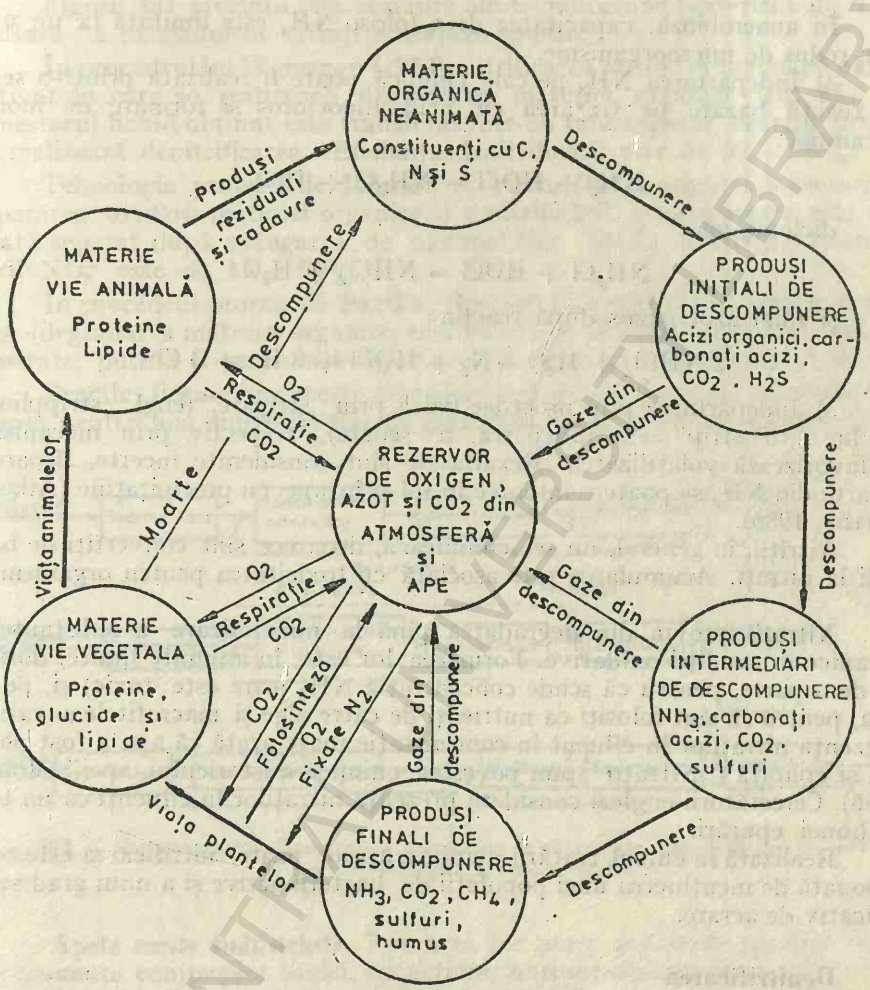



Fig. 380. — Ciclul carbonului, al azotului și al sulfului în cursul tratării anaerobe a apelor de canal (după Moore, 1956).

**Îndepărtarea $NH_3$.** Prezența unei concentrații mai mari de $NH_4^+$ indică existența unor procese recente de descompunere a materiei organice și implicit riscul ca apa respectivă să fie potențial infectată. Îndepărtarea se poate realiza pe mai multe căi:

1) În prezența oxigenului, $NH_3$ este oxidat de bacterii la nitriți și final la nitrați:

$$NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$$

Procesul este stimulat prin aerare intensă și prelungită, în tancuri sau bazine de aerare, care favorizează nitrificarea.

În anaerobioză, capacitatea de a folosi $NH_3$ este limitată la un număr redus de microorganisme.

2) Îndepărtarea $NH_3$ pe cale chimică poate fi realizată printr-o serie de reacții bazate pe tratarea cu acid hipocloros și formare de monocloramină :

$$NH_3 + HOCl \rightarrow NH_2Cl + H_2O,$$

dicloramină :

$$NH_2Cl + HOCl \rightarrow NHCl_2 + H_2O$$

și final azot gazos după reacția :

$$2\,NHCl_2 + H_2O \rightarrow N_2 + HOCl + 3\,H^+ + 3\,Cl^-$$

3) Îndepărtarea prin procedee fizice prin „stripare" (engl. „strippling" de la ; „to strip" = a îndepărta, a scoate), respectiv prin mecanisme ce favorizează volatilizarea. Rezultatele sînt considerate incerte, deoarece o parte din $NH_3$ se poate reîntoarce în sol și în ape cu precipitațiile (Atlas și Bartha, 1985).

**Nitriții,** în general, nu se acumulează, deoarece sînt convertiți de bacterii la nitrați. Acumularea este asociată cu toxicitatea pentru organismele vii.

**Nitrații** provin din degradarea pînă la mineralizare a substanțelor organice în condiții oxidative. Formarea lor este, în anumite limite, dorită, pe de o parte, pentru că scade concentrația $NH_3$ (care este toxic) și, pe de alta, pentru că sînt folosiți ca nutrienți de către alge și macrofitele acvatice. Prezența nitraților în efluent în concentrație mare arată că apa a fost poluată și epurată („Nitrații spun povestea chimică a istoricului apei" Moore, 1956). Cercetătorii englezi consideră prezența nitraților în efluenți ca un test al bunei epurări.

Realizată în cursul tratării aerobe a apelor uzate, nitrificarea este condiționată de menținerea unei populații de bacterii active și a unui grad semnificativ de aerare.

### Denitrificarea

Denitrificarea efluenților care conțin nitrați se realizează în bazine anaerobe, însămînțate cu nămol recirculat, după adăugarea unei surse de C și energie (cel mai frecvent metanolul), după reacțiile :

$$(1)\quad NO_3^- + 1/3\,CH_3OH \rightarrow NO_2^- + 1/3\,CO_2 + 2/3\,H_2O$$

$$(2)\quad NO_2^- + 1/2\,CH_3OH \rightarrow 1/2\,N_2 + 1/2\,CO_2 + 1/2\,H_2O + (OH)^-$$

Reacția globală este :

$$6\,NO_3 + 6\,H^+ + 5\,CH_3OH \rightarrow 3\,N_2 + 5\,CO_2 + 13\,H_2O$$

Reducerea a 30 mg/l N din $NO_2^-$ necesită 74 mg/l metanol și duce la formarea a 16 mg/l celule bacteriene, care conțin 2 mg/l N asimilat (deci, în cursul denitrificării, mai puțin de 6% din azotul anorganic este asimilat sub formă de proteine celulare.

Figura 381 prezintă trei variante ale tehnologiilor bacteriene de îndepărtare a excesului de nitrați din apele epurate :

În procedeul lui Wuhrman (1964), nitrificarea are loc în tancul cu nămol activat în care se realizează degradarea materiei organice (fig. 381 A). Amestecul lichid obținut este transferat într-un tanc separat, neaerat, în care se realizează denitrificarea. Eficiența denitrificării este de 50 — 70%.

Tehnologia propusă de Johnson și Vanta (1971) asigură, de asemenea, separarea oxidării materiei organice și a nitrificării. Denitrificarea este realizată separat după adăugarea de metanol (fig. 381B). Eficiența îndepărtării $NO_3^-$ este de 80 — 90%.

În procedeul propus de Bartha, Brenner și Lewis (1968), cele trei procese (degradarea materiei organice, nitrificarea și denitrificarea) sînt complet separate, putînd fi controlate riguros și cu eficiență maximă (fig. 381 C).

Practic, fiecare din aceste tehnologii are avantaje și dezavantaje. Opțiunea pentru una dintre ele ține de gradul de îndepărtare a nitraților dorit.

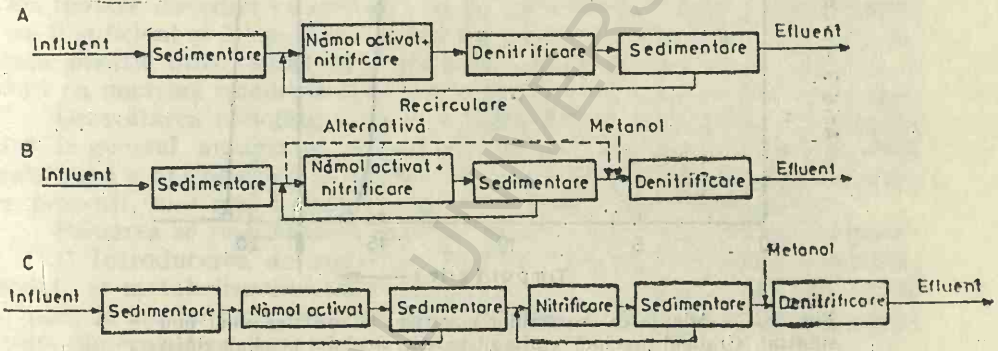



Fig. 381. — Reprezentarea schematică a proceselor de nitrificare—denitrificare în sistemele de epurare biologică a apelor uzate.

**Apele uzate industriale.** Epurarea lor pune probleme speciale legate de prezența compușilor toxici, cu acțiune antimicrobiană sau a celor recalcitranți la biodegradare. Compușii nedegradabili, cum sînt, spre exemplu, unii detergenți evacuați cu apele uzate în rîuri rămîn ca atare și produc spumarea apei, chiar după ce au parcurs kilometri în aval.

Unele ape industriale sînt bogate în glucide și deficitare în N și alte elemente necesare microorganismelor. Ele nu pot fi supuse procedeelor de epurare biologică decît dacă li se adaugă nutrienții care le lipsesc.

**Leșiile sulfitice** pot conține pînă la 50 — 60% lignine, 15 — 22% glucide, 8 — 12% $SO_2$ și 7 — 10%C. În cursul degradărilor, levurile pot ajunge în apele reziduale pînă la $10^6$ celule/ml (*Hansenula, Pichia, Rhodotorula*) iar bacteriile la $10^7$/ml.

Microorganismele au capacitatea de a se adapta față de prezența unor substanțe noi, recent introduse în sistem (fig. 382). Adaptarea este consecutivă, probabil, selecției rarelor celule sau populații capabile să degradeze compusul respectiv. După ce s-au realizat adaptarea și multiplicarea microorganismelor active, procesul de biodegradare evoluează rapid.

**Apele reziduale ale industriei laptelui** diferă foarte mult de apele de canal menajere și, ca urmare, microorganismele implicate în tratarea lor sînt foarte diferite.

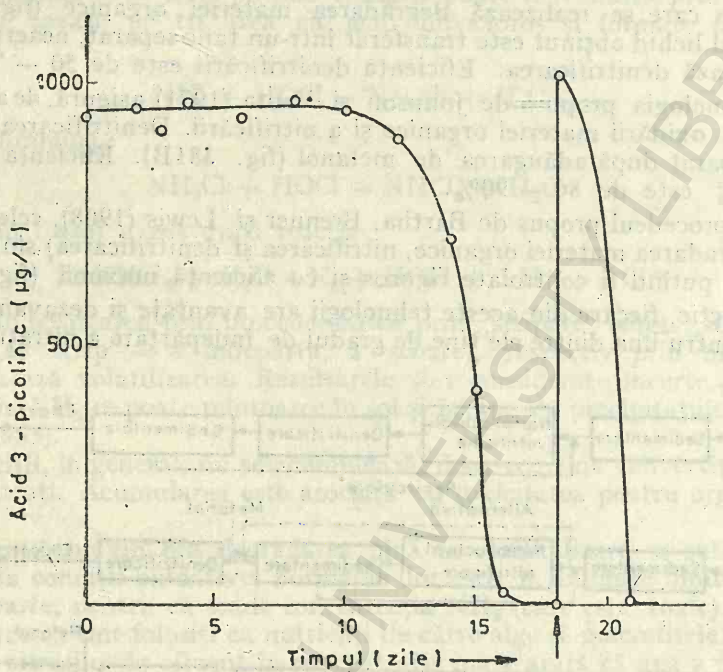



Fig. 382. — Adaptarea bacteriilor acvatice la oxidarea unui nou substrat. Graficul prezintă curba dispariției acidului picolinic după adăugarea acestuia într-o probă de apă de riu. După prima adăugare se observă o perioadă prelungită de lag, înainte de inițierea degradării. După a doua adăugare, degradarea oxidativă evoluează foarte rapid (după Ettinger, Lishka și Kroner, 1954).

Cele mai frecvent întîlnite sînt: *Bacillus firmus, B. circulans, B. laterosporus, B. lentus, B. pasteurii, Corynebacterium bovis, Flavobacterium aquatile, F. breve, F. suaveolens, Micrococcus flavus, Micrococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus* etc. Sînt prezenți, de asemenea, dar puțin numeroși, unii fungi, precum și protozoare (Porges, 1960 ; Taber, 1976).

**Reziduurile din zootehnie** sînt frecvent bogate în *Enterobacteriaceae*, dintre care *Escherichia coli* poate reprezenta 90%. Sînt, de asemenea, prezente *Salmonella* sp. Ele sînt tratate, de regulă, prin procedee anaerobe, vizînd producerea de metan, $CO_2$ și biomasă bacteriană. Apele reziduale provenite de la creșcătoriile de porcine nu favorizează creșterea microorganismelor și, în consecință, trebuie diluate în prealabil (Hobson și Shaw, 1974). Se recurge curent la procedee anaerobe, care sînt adecvate unor concentrații mari de substanțe organice ($CBO_5$ ridicat). În cursul evoluției lor se acumulează mult $H_2$, deoarece dezvoltarea bacteriilor metanogene nu este masivă (Hobson și Shaw, 1974).

Microorganismele cele mai frecvent întîlnite sînt *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Streptococcus* sp. ; cele celulozolitice ca, și *Enterobacteriaceae* sînt rare. Pe suprafața reziduurilor nediluate se pot dezvolta unele alge (Wilson și Houghton, 1974).

Mann (1975) a utilizat cu succes iazurile aerobe, înregistrînd o scădere de 90% a $CBO_5$.

## AUTOEPURAREA APELOR POLUATE

Foarte multe medii acvatice (lacuri, rîuri, estuare, litorale marine) sînt expuse periodic unor procese de poluare cu ape uzate menajere sau provenite din crescătorii de animale, industrie, eliminări de reziduuri etc. Acestea produc modificări importante în proprietățile fizice, chimice, biologice, reflectate în modificări cantitative și calitative ale microbiotei, ale florei și ale faunei sistemului.

Evacuarea deliberată a apelor uzate în bazinele acvatice s-a bazat pe două ipoteze dovedite ca eronate : 1) pe rolul diluției, care s-a demonstrat a nu fi suficient și 2 ) pe ideea că microorganismele au capacitatea de a degrada practic orice substanță naturală, oricît de complexă. Aceasta în acord cu doctrina infailibilității microorganismelor în procesele degradative.

Dezvoltarea societății umane, a industriei, a zootehniei și a agriculturii, în general, au agravat această situație atît prin mărirea considerabilă cantitativă a apelor uzate și reziduurilor, cît și prin complexitatea compușilor prezenți, unii mai rezistenți sau chiar recalcitranți la degradare.

Poluarea se realizează pe trei căi majore, care nu se exclud reciproc :

1) Introducerea de materiale biogene (substanțe organice poluante, produși ai metabolismului unor organisme etc. în concentrații neobișnuit de mari, în așa fel încît modifică în sens negativ echilibrul natural al populațiilor din ecosistem.

2) Introducerea de substanțe normal absente din apele naturale (pesticide etc.) sau determinarea unor concentrații nenormale, cu efect nociv ale unor compuși (săruri ale metalelor grele etc.).

3) Introducerea de agenți patogeni sau a altor microorganisme nedorite în bazinul acvatic

### Modificări induse de evacuarea apelor reziduale

Deversarea unei ape reziduale nepurate într-o apă stătătoare (lac) determină instalarea temporară a unei perioade de modificare „septică" a mediului respectiv, îmbogățirea lui în substanțe organice, epuizarea oxigenului și reducerea densității biologice (Hynes, 1960 ; Atlas și Bartha, 1985).

Mineralizarea substanțelor organice sub acțiunea microorganismelor poate genera o îmbogățire în nutrienți anorganici și fenomene de „înflorire" algală, pentru ca, în măsura în care nu intervin noi perturbări, după o perioadă de timp, modificările să se atenueze, treptat, situația revenind la normal.

Consecințele poluării au fost studiate, în special, în cazul rîurilor, în care deversarea apelor uzate determină modificări esențiale ale unor parametri fizici, chimici și biologici.

Una din modificările majore este dezvoltarea intensă a bacteriei filamentoase *Sphaerotilus natans*, care se leagă de albia rîurilor sau de roci și formează matricea pentru dezvoltarea asociată a altor bacterii, precum și a

protozoarelor. Se formează o comunitate de microorganisme, descrisă sub denumirea de *biocenoză heterotrofă* sau sub cea cronată de fungi ai apelor de canal sau de dejecții (engl. „Sewage fungus" ; germ. „Abwasser Pilz"). Ea se dezvoltă excesiv în prima perioadă, degradînd substanțele organice, consumînd o cantitate importantă de oxigen și de nutrienți organici.

Dezvoltarea bacteriilor asociate cu *S. natans* are loc în anaerobioză și chiar la tensiuni scăzute de $O_2$. În condițiile unei poluări organice se dezvoltă microorganismele facultativ și obligat anaerobe, care devin membri dominanți ai microbiotei. Sub acțiunea lor, sistemul devine anoxic, ori de cîte ori consumul de oxigen depășește cantitatea cu care este reaprovizionat.

În unele cazuri, datorită dispariției oxigenului, masele de *S. natans* moarte sînt supuse unor procese de putrefacție. Se produc cantități importante de $H_2S$, sub acțiunea bacteriei *Desulfovibrio desulfuricans*, prezentă frecvent în apele de canal, care face reducerea sulfaților.

Unele ape poluate conțin bacterii sulfoxidante (*Thiobacillus* sp., *Thiothrix* sp., *Beggiatoa* sp. care se multiplică rapid în prezența $H_2S$.

Se adaugă acțiunea altor bacterii ca denitrificatoare (*Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans*), metanogene, și a celor care utilizează compușii fierului (*Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptothrix ochracea* etc.), care amplifică dezechilibrul profund față de microbiota activă normal.

În mod deosebit sînt expuse la anoxie sedimentele la nivelul cărora rata de difuzie a oxigenului este mică, fiind dependentă de structura acestora și de activitatea animalelor care o perturbă, mărind suprafața de contact a particulelor din sediment cu coloana de apă. Dacă sedimentul devine anoxic, populația animală devine mai mică, limitată la suprafața lui și, final, dispare (Poole și Hobson, 1979).

**Autoepurarea** este un proces complex, implicînd intervenția unor mecanisme fizice, chimice și biologice, care conferă unui bazin acvatic poluat capacitatea de revenire la echilibrul natural caracteristic, prin degradarea și prin eliminarea poluanților (substanțe organice, anorganice și microorganisme). Datorită acestui proces, în cazul apelor curgătoare, după cîțiva km în aval de locul deversării poluanților, apele redevin relativ curate.

Evoluția acestui fenomen este influențată de gradul de poluare (cantitatea și ritmul de deversare a apelor uzate) și de diluție, de viteza de scurgere a apei care determină un amestec mai mult sau mai puțin rapid, de turbulență și de temperatură (apele tropicale se autoepurează mai repede decît cele polare ; la temperaturi mai mari, autoliza bacteriană este mai rapidă).

Un rol decisiv revine bacteriilor, protozoarelor și unor animale mici. În condiții aerobe, microorganismele degradează substanțele dizolvate pînă la $CO_2$, apă și săruri anorganice, asigurînd mineralizarea poluanților organici. Inițial sînt degradate substanțele ușor asimilabile (glucide, proteine, lipide) și ulterior cele mai rezistente, cum este, spre exemplu, celuloza. De aceea, pe măsură ce rîul înaintează și gradul de autoepurare progresează, numărul microorganismelor saprofite scade, iar cel al celor celulozolitice crește. Cînd un rîu este poluat cu ape de canal proaspete apar o serie de modificări ce se mențin o anumită distanță în aval, după care dispar.

În procesul de autoepurare, materia organică vegetală sau animală este convertită de microorganismele aerobe la săruri anorganice simple, care sînt folosite ca nutrienți de microorganisme și organismele vegetale.

În acest proces, oxigenul din apă este convertit la $CO_2$, care, sub influența luminii (fotosinteză), este preluat de plante. Carbonul este folosit pentru sinteza de constituenți vegetali, prin conversie la substanțe organice, iar oxigenul se reîntoarce în apă. Prezența oxigenului în apă este esențială pentru realizarea ciclului de autopurificare.

Întreg procesul de mineralizare a materiei organice este realizat eficient numai de microorganismele aerobe.

În plus, etapa sa finală — nitrificarea — necesită un consum important de oxigen (conversia unui mg de $NH_4^+$ la nitrat necesită 4,57 mg $O_2$). Apele naturale conțin $O_2$ dizolvat prin difuzie din atmosferă (proces favorizat de fenomenele de turbulență) sau eliberat de cianobacterii, alge și macrofitele acvatice în urma fotosintezei.

În mediile respective există și un consum chimic de oxigen, determinat de oxidarea abiotică a compușilor reduși, existenți ca atare în apele poluate sau formați în sistem (spre exemplu, sulfurile produse de bacteriile sulfatreducătoare. De aceea, autoepurarea este condiționată de prezența unei cantități suficiente de oxigen dizolvat, necesar pentru activitatea bacteriilor, care, degradînd substanțele organice, produc $CO_2$ și substanțe minerale, asigurînd astfel dezvoltarea viguroasă a organismelor fotosintetizante ce redau apei oxigenul necesar, închizînd ciclul acestuia.

Descărcările masive de materie organică odată cu apele poluate determină un deficit de $O_2$ prin consumul intens efectuat de microorganismele heterotrofe și o diminuare a fotosintezei produsă de turbiditatea mărită a apei.

După o distanță variabilă în aval (fig. 383), numărul bacteriilor heterotrofe scade în progresie geometrică, sub influența unor cauze complexe, care includ, pe lîngă efectul de diluție fenomenele de sedimentare, inactivarea sub acțiunea radiațiilor UV, temperatura neadecvată, oligotrofia, intervenția prădătorilor (*Bdellovibrio bacteriovorus*, *Vorticella* sp., *Stylonychia* sp. etc.).

Pe baza unor date experimentale, Sturdza și colab. (1959) acordă o importanță deosebită protozoarelor în îndepărtarea unei suspensii de

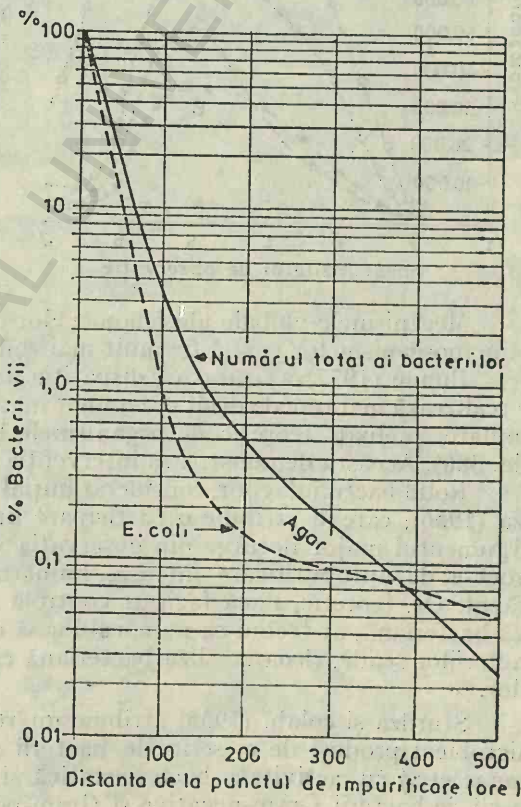



Fig. 383. — Diminuarea numărului bacteriilor heterotrofe și în particular a bacteriei *Escherichia coli* după contaminarea rîului Ohio (după Frost și Streeter, 1924).

*Salmonella typhi* din apa de rîu, numărul lor fiind corelat cu creșterea bacteriilor vii, pe care le consumă, pentru a dispărea odată cu dispariția acestora (fig. 384). Se adaugă acțiunea faunei bacterivore (*Cladophora, Tubificidae, Chironomus, Assellus* etc.) (fig. 385), al căror rol este demonstrat de numărul mare de microorganisme aflate în diferite faze de degradare în intestin. Acestea înglobează, odată cu detritusul organic fin, numeroasele bacterii fixate pe suprafața acestuia.

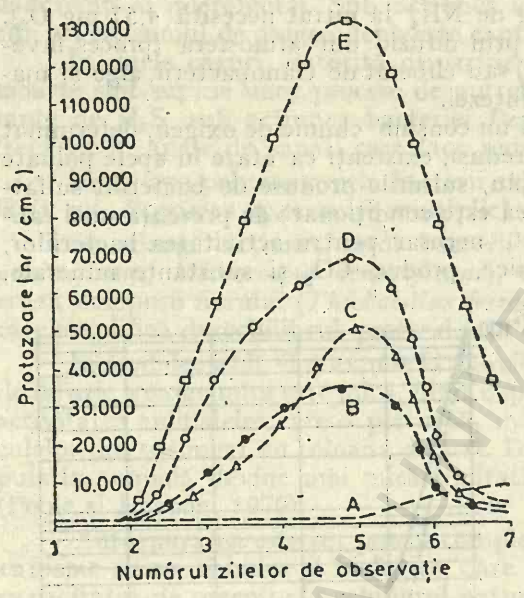


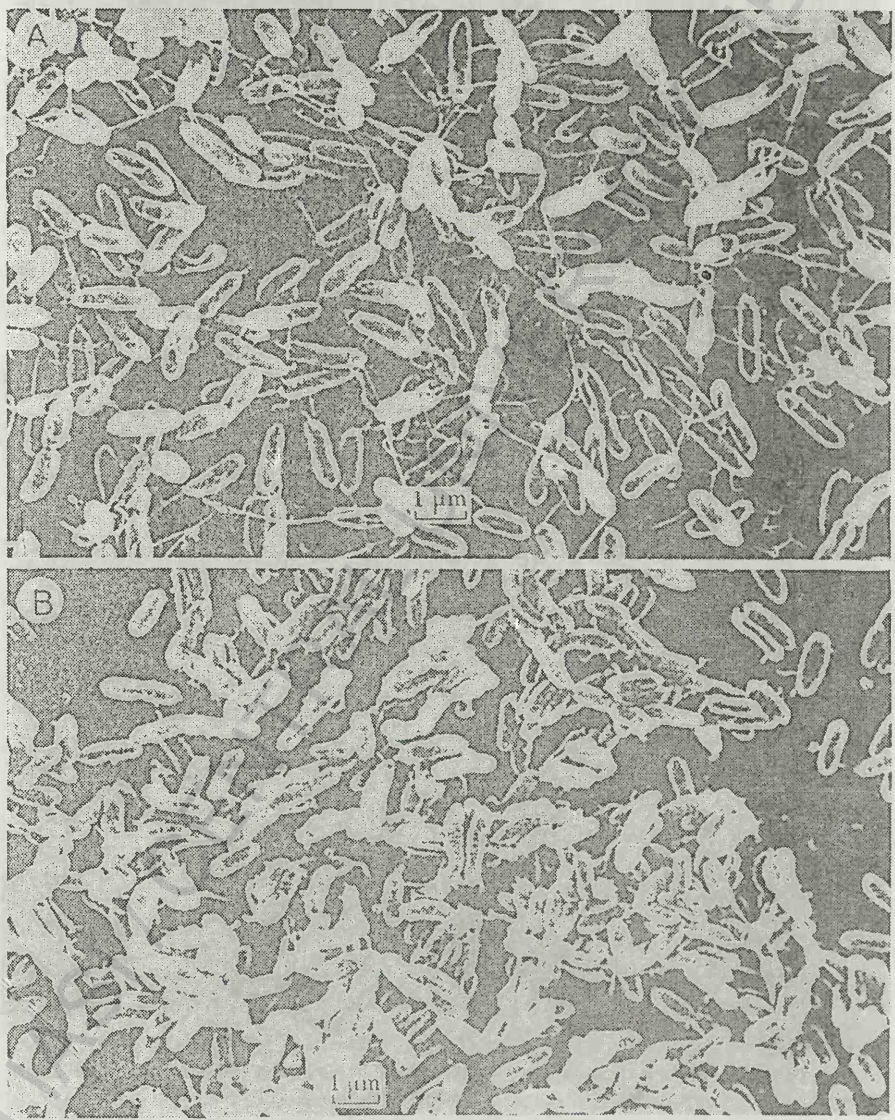

Fig. 384. — Rolul protozoarelor în îndepărtarea bacteriei *Salmonella typhi* dintr-o probă de apă. **A.** Numărul protozoarelor în apa de rîu ca atare. **B.** După adăugarea unui extract de *S. typhi*. **C.** După adăugarea bacteriilor omorîte. **D.** După adăugarea bacteriilor și a extractului. **E.** Cu bacterii vii. După consumarea populației bacteriene, protozoarele revin la normal (după Sturdza, 1959).

Mecanismele globale ale fenomenelor de autoepurare și de îndepărtare a microorganismelor par să fie mult mai complexe decît se bănuia.

Bunde (1977) a arătat că dispariția unei populații de *Escherichia coli* se realizează mai repede decît cea a unor markeri cu proprietăți fizico-chimice similare, preluați teoretic de organismele bacterivore cu aceeași frecvență (fig. 386). Aceasta demonstrează intervenția unor mecanisme selective.

Rolul bacteriofagilor, considerat inițial ca major, este contestat de Sturdza (1956), care le atribuie o participare limitată, secundară sau chiar nulă. Argumentul major decurge din observația că în rîurile în care au avut loc procese de autopurificare intensă, numărul particulelor fagice este mult scăzut. Or, teoretic, dacă fagii ar controla procesele de autopurificare prin liză bacteriană, ar trebui ca numărul lor să crească în fazele în care numărul bacteriilor scade, deoarece liza bacteriană este asociată cu multiplicarea fagilor.

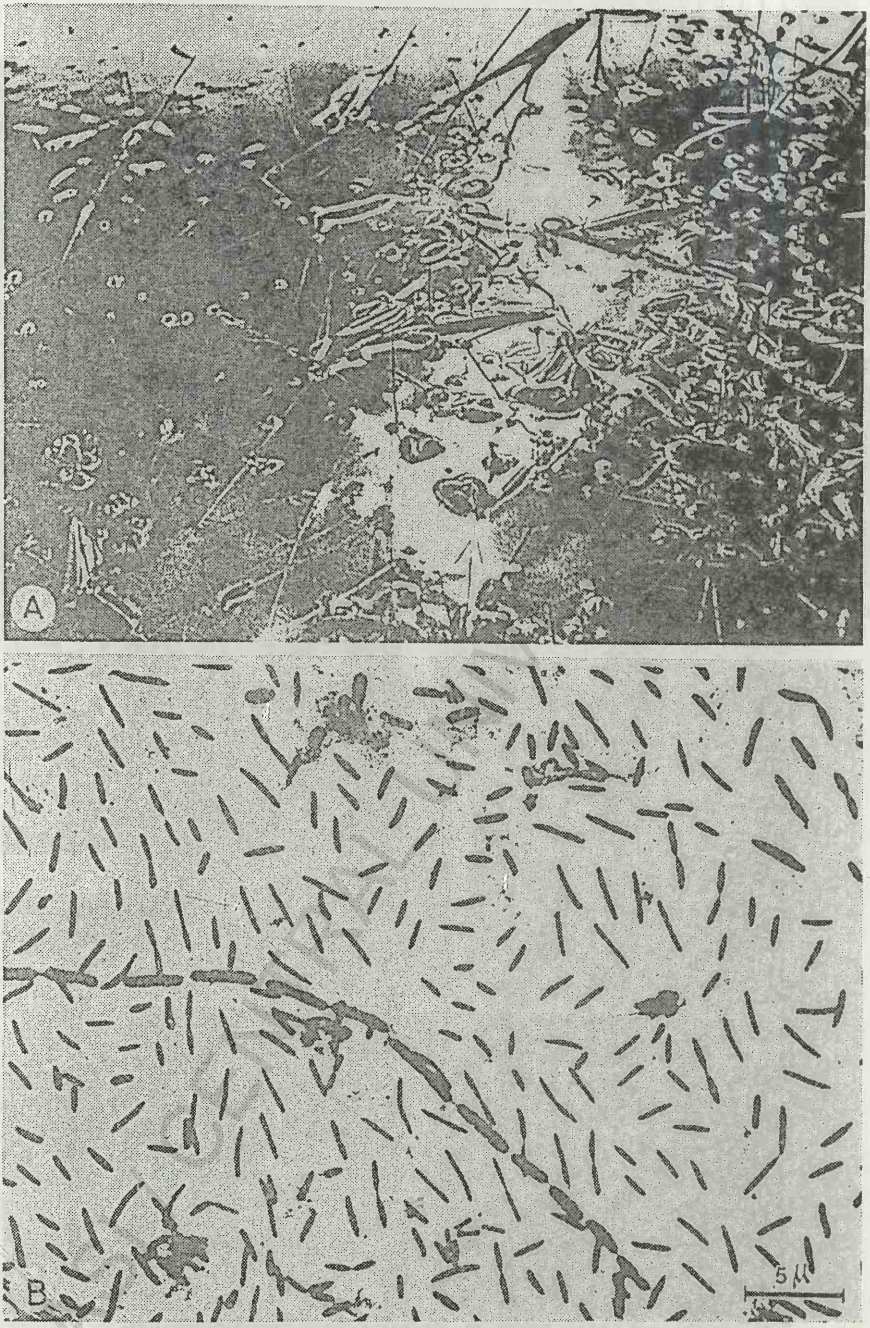
Sturdza și colab. (1955) atribuie un rol mai important factorilor antimicrobieni produși de o serie de bacterii (*Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas* etc.) cu activitate bacteriostatică și bactericidă asupra mai multor specii de bacterii Gram-negative și Gram-pozitive. Capacitatea de autoepurare a apelor naturale de materiile organice și de microorganismele poluante este rezultatul unui echilibru delicat între cantitatea de $O_2$ absorbită din atmosferă și cea revenită în apă prin intermediul fotosintezei, pe de o parte,




Planşa I – Celule bacteriene legate prin fimbrii la suprafaţa unei ape stagnante (A) şi dispuse în agregate (B) (după Ellwood şi colab., 1976).

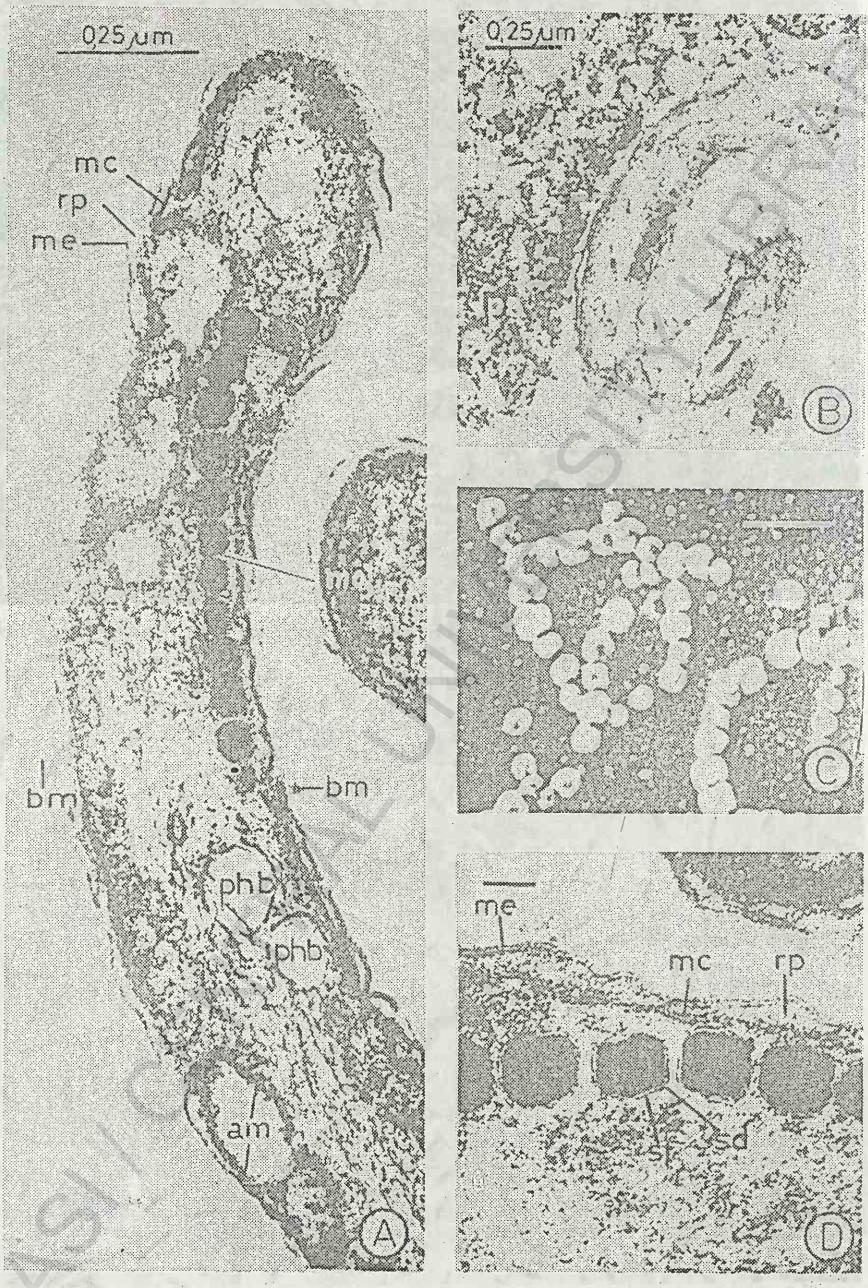
BCU LIBRARY

Planşa 2 – Voal bacterian la suprafaţa apei, lăsată la temperatura laboratorului (după Thiéry şi colab., 1976).

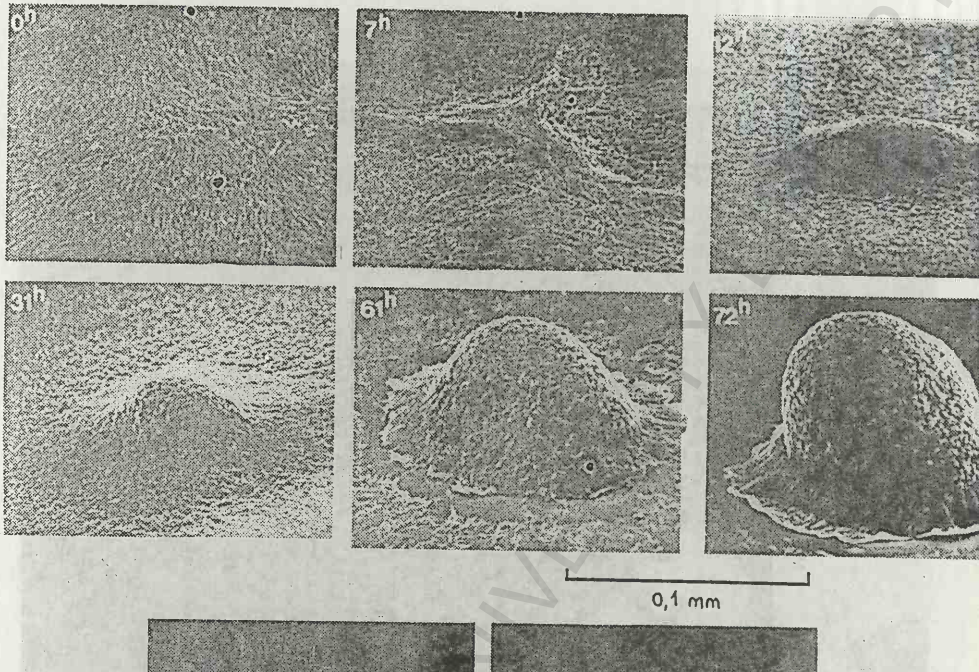


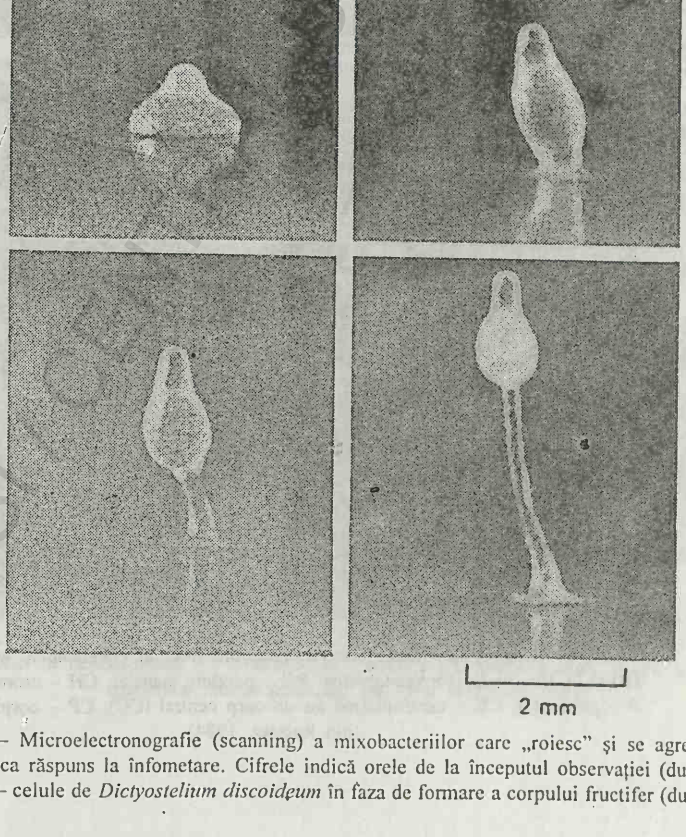

Planşa 3 – Peliculă de biofilm la suprafaţa apei unui lac, incluzînd trichoame de celule cilindrice *(Leptothrix sideropous)*, înconjurate de o teacă, ce plutesc vertical, rămînînd legate la suprafaţă printr-o „bază" sau un „disc" plutitor polizaharidic (după Thiéry şi colab., 1973).

BCU



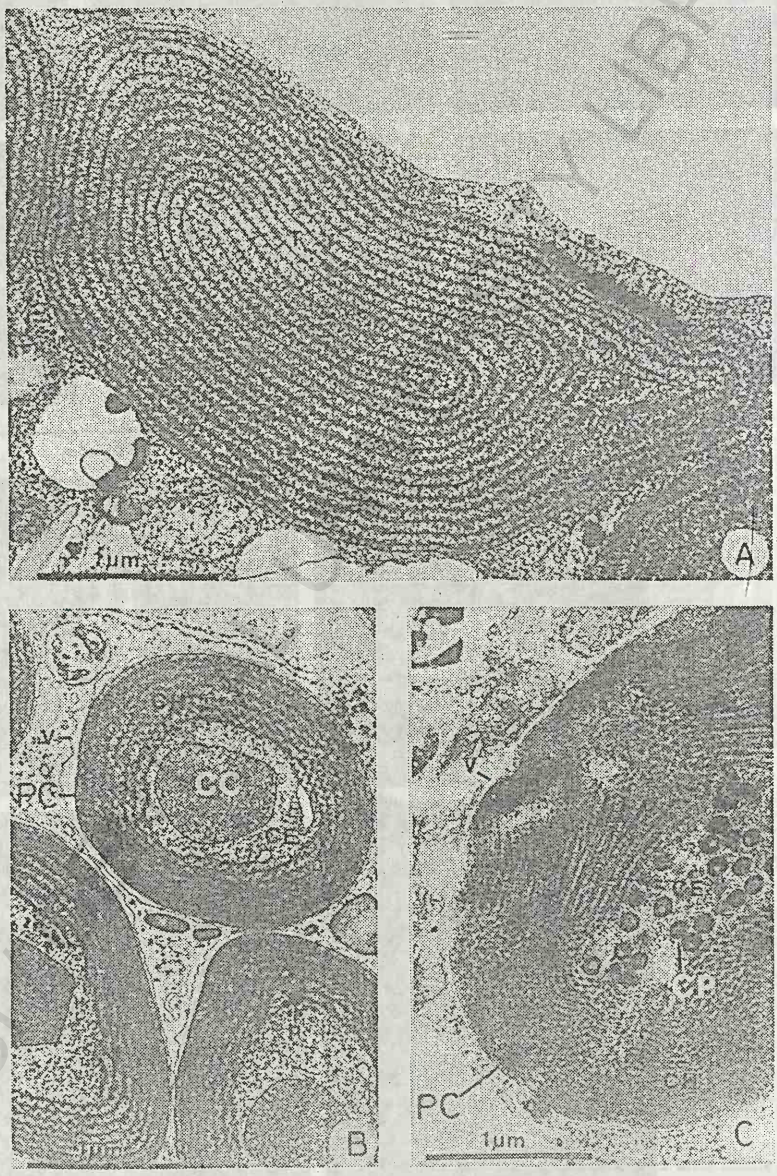

Planşa 4 – *Aquaspirillum magnetotacticum.* Microelectronografia pe secţiuni ultrafine a unor celule magnetotactice (**A, B**). Magnetosomii izolaţi (**C**) şi detaliile structurii lor (**D**): me – membrană externă; am – anse membranare; rp – regiune periplasmică; phb – poli-β-hidroxibutirat; lps – lipopolizaharid; st – strat electronotransparent; sd – strat electronodens; bm – bucle membranare pe suprafaţa externă (după Balkwill şi Blakemore, 1980).



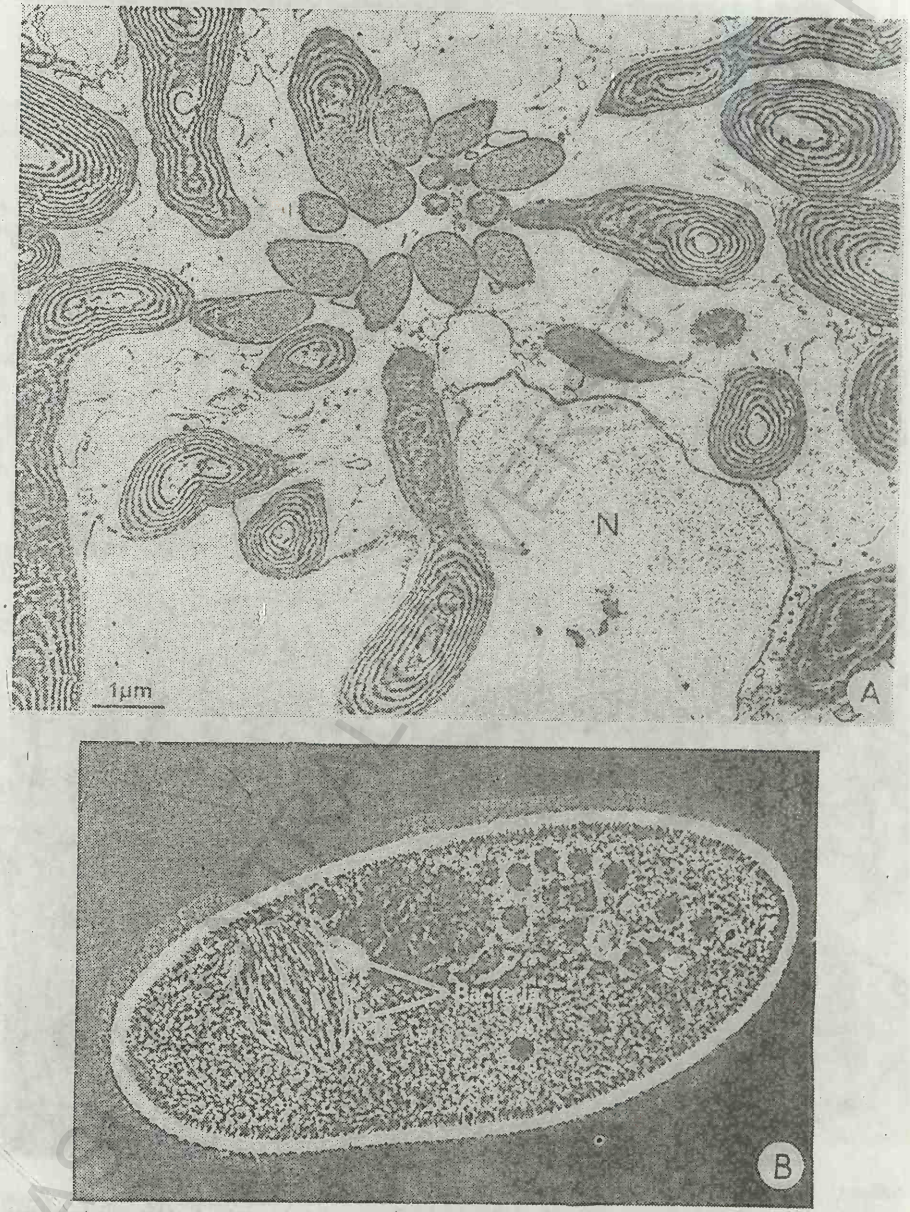

Planșa 5 – Microelectronografie (scanning) a mixobacteriilor care „roiesc" și se agregă formînd corpi fructiferi, ca răspuns la înfometare. Cifrele indică orele de la începutul observației (după Kunner, 1983) (sus). Jos – celule de *Dictyostelium discoideum* în faza de formare a corpului fructifer (după Bonner, 1983).

BCU IAȘI



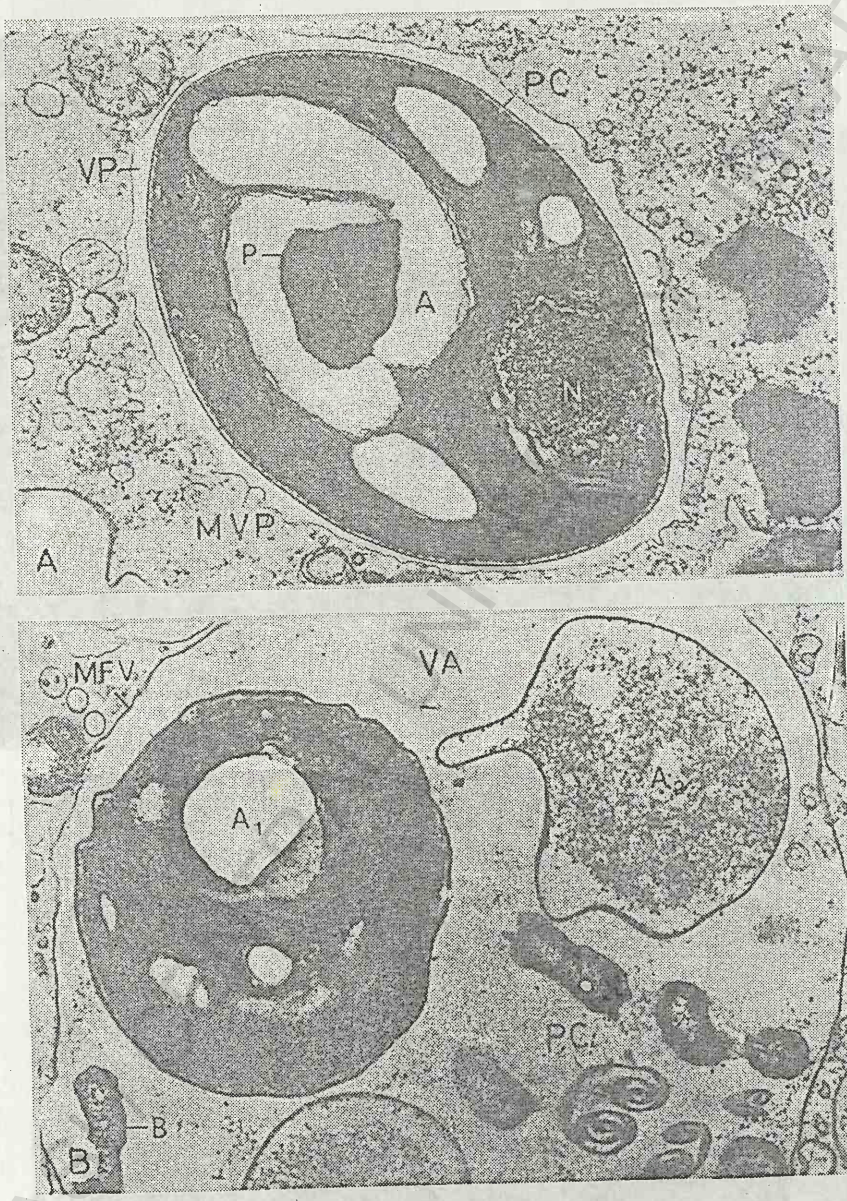

Planșa 6 – Cianele în *Glaucosphaera vacuolata* (A), în *Gloeochaete wittrockiana* (B) și în *Paulinella chromatophora:* PC – peretele cianelei; CH – cromatoplasmă; P – polifosfat; CE – centroplasmă cu un corp central (CC); CP – corpi poliedrici (din Reisser, 1984).

BCU IAȘI LIBRARY




Planşa 7 – Cianele în *Glaucocystis nostochinearum*. Sînt evidenţiaţi tilacoizii formaţi din lamele concentrice. Extremităţile distale ale cianelelor sînt lipsite de membrane fotosintetizante şi converg într-un punct al celulei-gazdă. C – cianelă; N – nucleu (A) (după Lefort, 1965). B – bacterii simbiotice într-un protozoar (B) (din Wistreich, 1988).

BCU

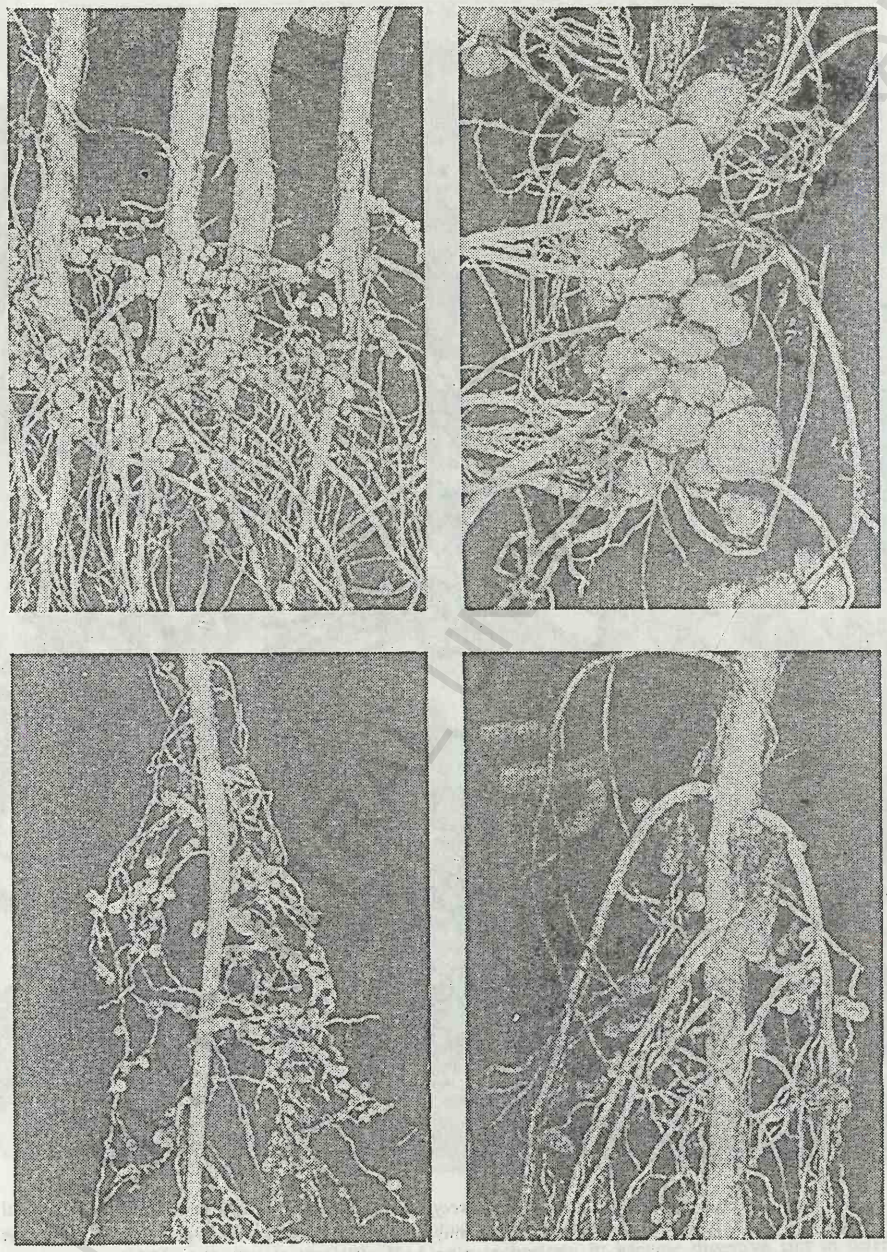



Planşa 8 – Celule de *Chlorella* simbiotice în *Paramecium bursaria*. A. Alga este localizată într-o vacuolă perialgală (VP). B. Algele sechestrate în vacuole digestive sînt în diferite stadii de digestie ($A_1$, $A_2$): PC – perete celular; VA – vacuolă digestivă cu alge; N – nucleu; A – amidon; MVP – membrana vacuolei perialgale; MFV – membrana vacuolei digestive; B – bacterie (după Reisser şi Wiessner, 1984).

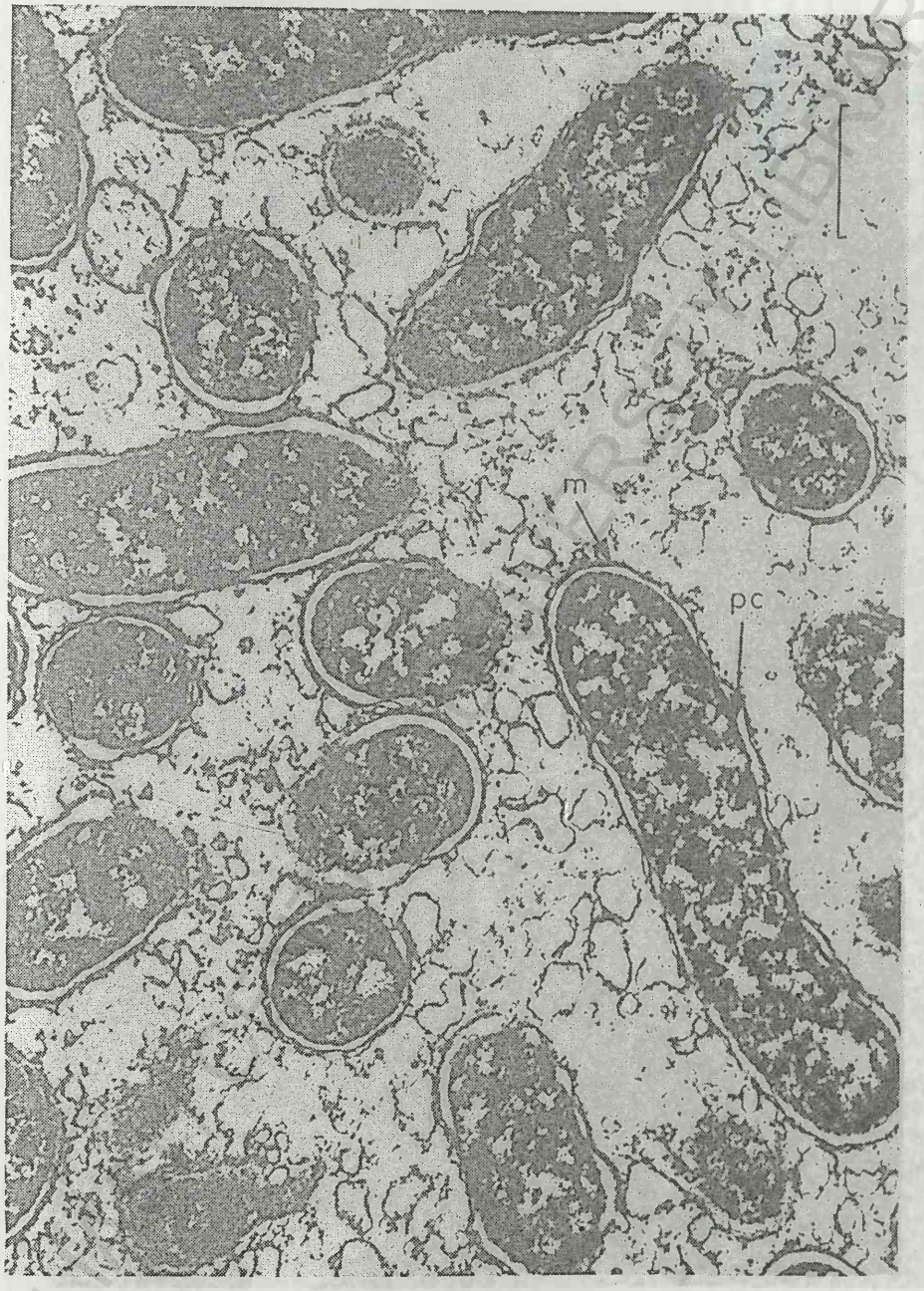
BCU IAŞI LIBRARY

Planşa 9 – Secţiune transversală prin *Convoluta roscoffensis* evidenţiind o algă simbiotică: N – nucleul algal; EN – nucleul unei celule epidermice; M – muşchi. Celula algală prezintă prelungiri digitiforme orientate spre suprafaţa animalului (după Muscatine, Pool şi Trench, 1975).

BCU LIBRARY

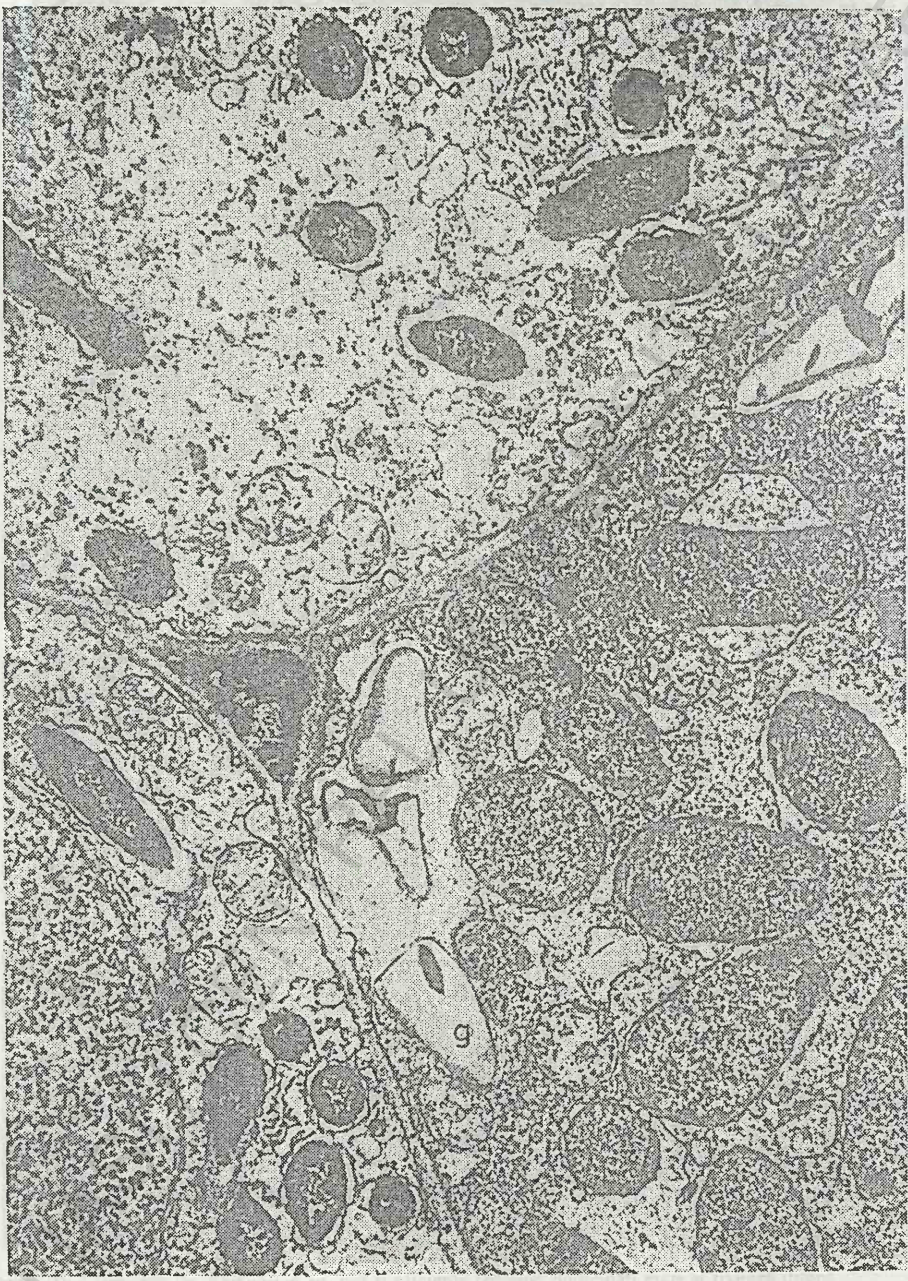


Planșa 10 – Tulpinile de *Rhizobium* sp. pot fi eficiente (produc nodozități mari și fixează intens $N_2$) sau ineficiente (produc nodozități mici, utilizează nutrienții furnizați de plantă și fixează slab sau deloc $N_2$). Sus – plante de soia, jos – trifoi (după Burton, 1976).

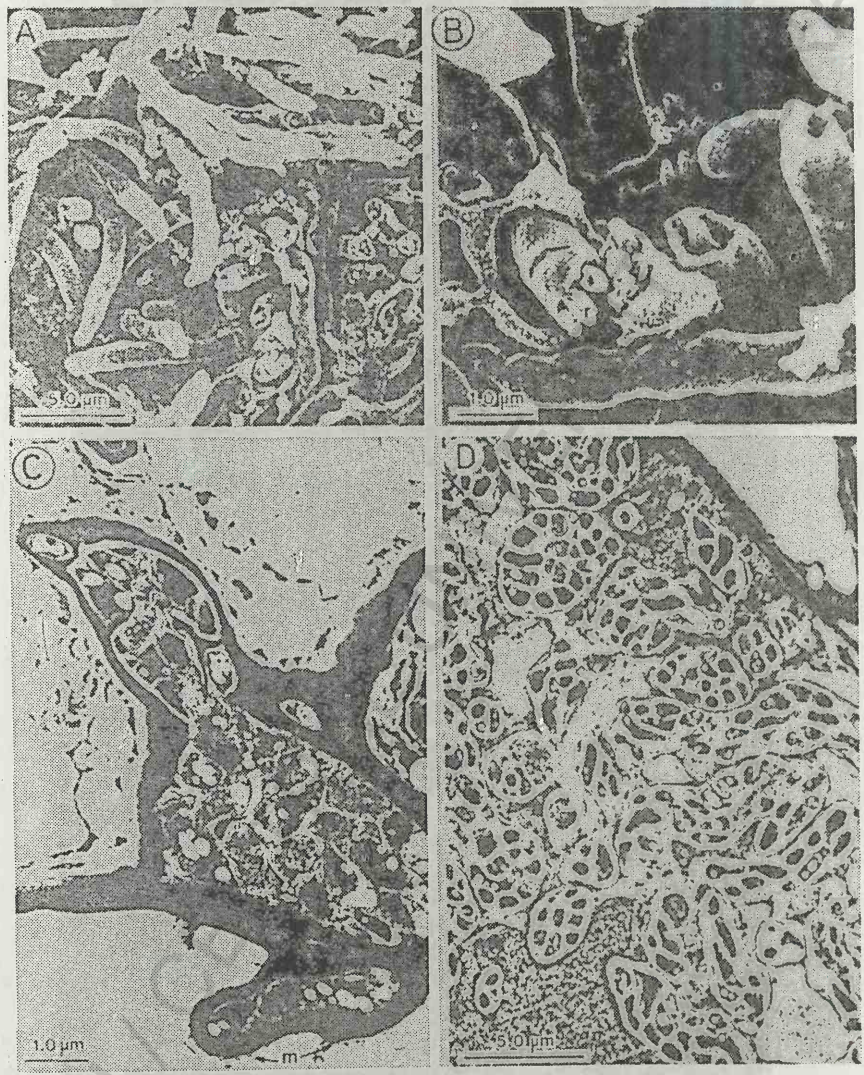



Planșa 11 – *Rhizobium meliloti.* Secțiune printr-o nodozitate de lucernă *(Medicago sativa),* evidențiind bacteroizi înconjurați de membrane cu pereți dubli (m): pc – peretele bacteroidului apare ca un strat întunecat. Materialul nuclear al bacteroidului este mai dispersat și constă din filamente fine osmofile, într-o matrice transparentă pentru electroni (după Jordan și colab., 1963): bara = 1,0 μm.

BUCUREȘTI BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

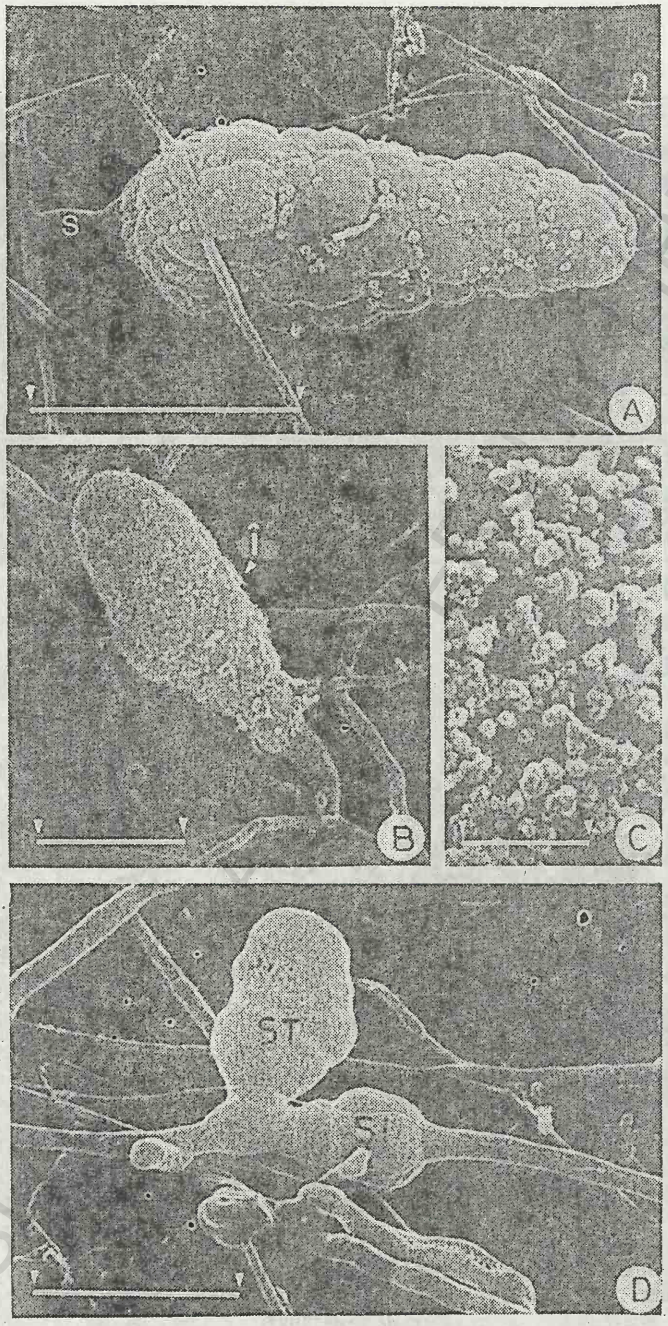



Planşa 12 – Secţiune transversală printr-o nodozitate de la trifoi, evidenţiind cîteva celule adiacente infectate cu *Rhizobium*. Celula din dreapta conţine bacteroizi (b), iar celelalte, două bacterii nediferenţiate: g – granule probabil de amidon; m – mitocondrie (după Beringer şi colab., 1979).



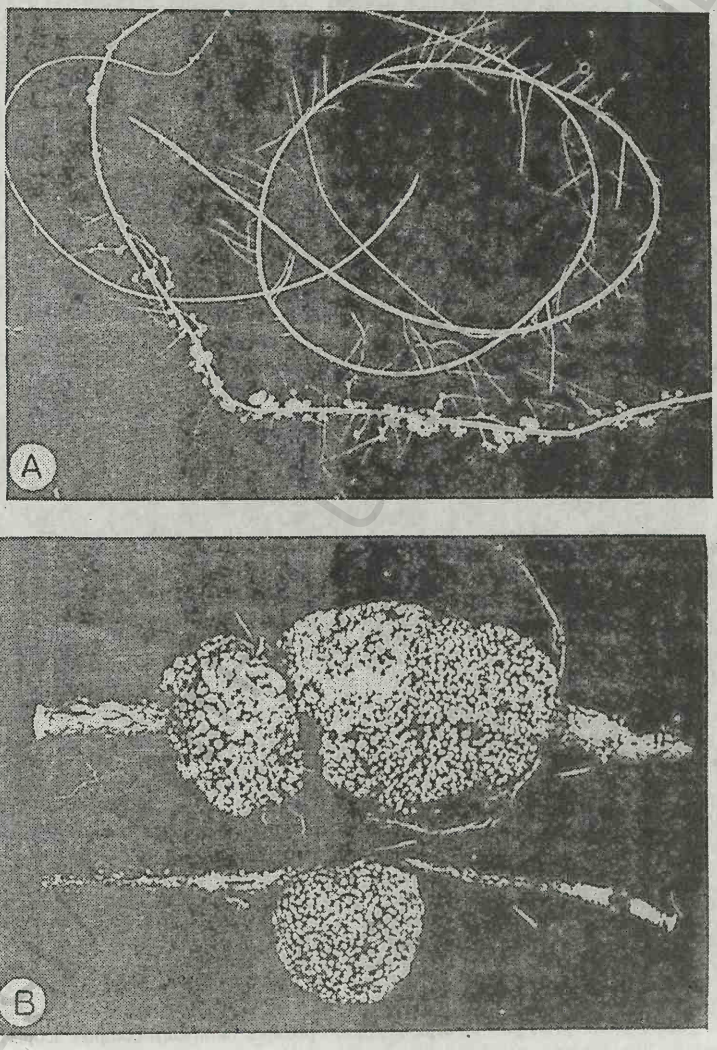

Planşa 13 – *Rhizobium* sp. sub formă de filamente prezente în celule de *Campsiandra* sp. **(A, B)** şi în nodozităţile de la *Poecilanthe parviflora* **(C, D)**: m – plasmalema (după Sprent, Intherland şi de Faria, 1987).

BCU IAŞI



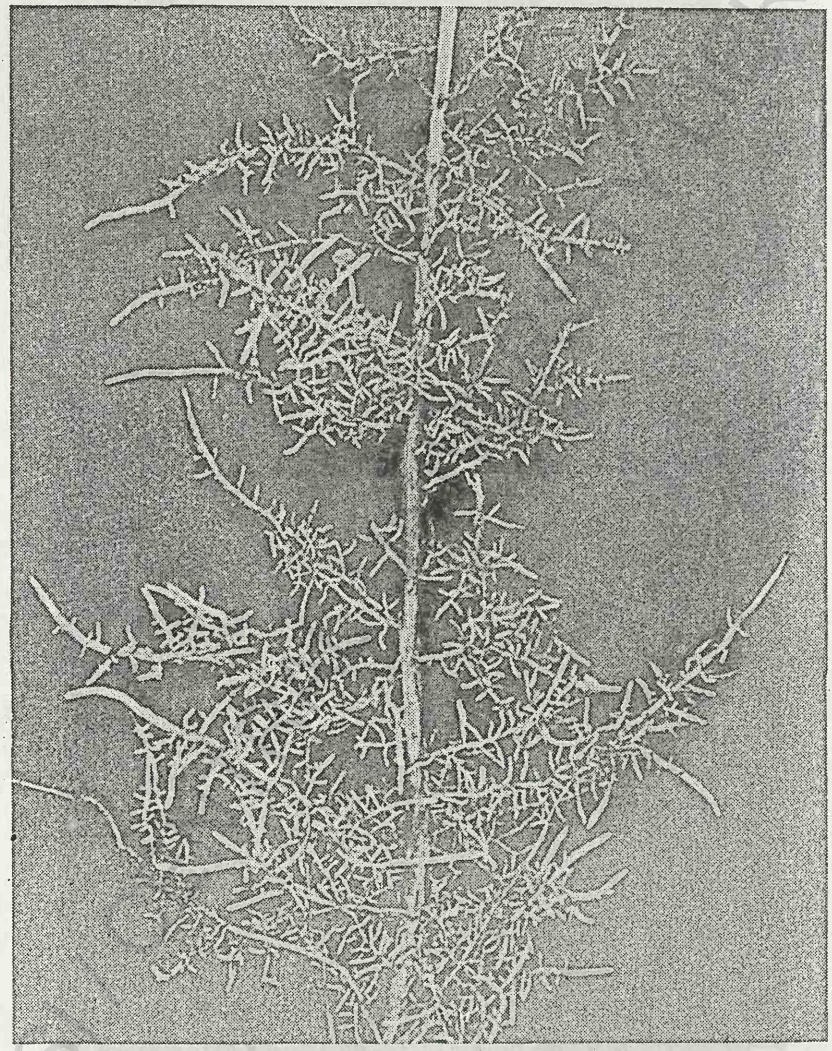

Planşa 14 – Actinorize. Aspectul microsimbiontului *(Frankia* sp.) cultivat *in vitro.* Microelectronografia (scanning) evidenţiază un mare sporangiu (A) legat de un filament vegetativ printr-un sporangiofor îngroşat (S): bara = 10 µm. B, C. Aspectul învelişului (î) care acoperă sporangiul: ST – sporangiu terminal; SI – sporangiu intercalar: barele = 5 µm (după Baker şi Torrey, 1980).

BCU IAŞI LIBRARY



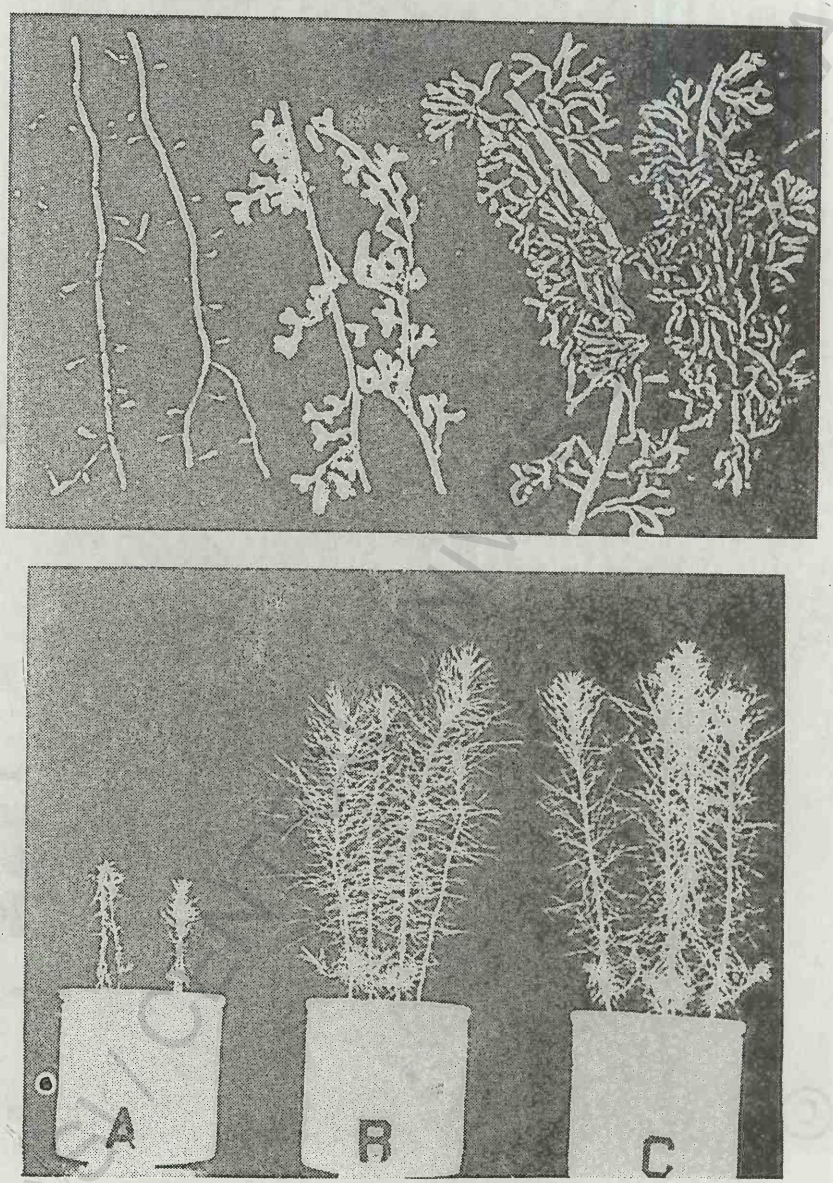

Planșa 15 – Fixarea biologică a azotului de plantele neleguminoase. A. Nodozități tinere de la *Hippophaë rhamnoides,* dezvoltată în mediu hidroponic. B. Nodozități la plante de *Alnus glutinosa,* recoltate din natură (după Bond, 1963).

BCU IAȘI LIBRARY

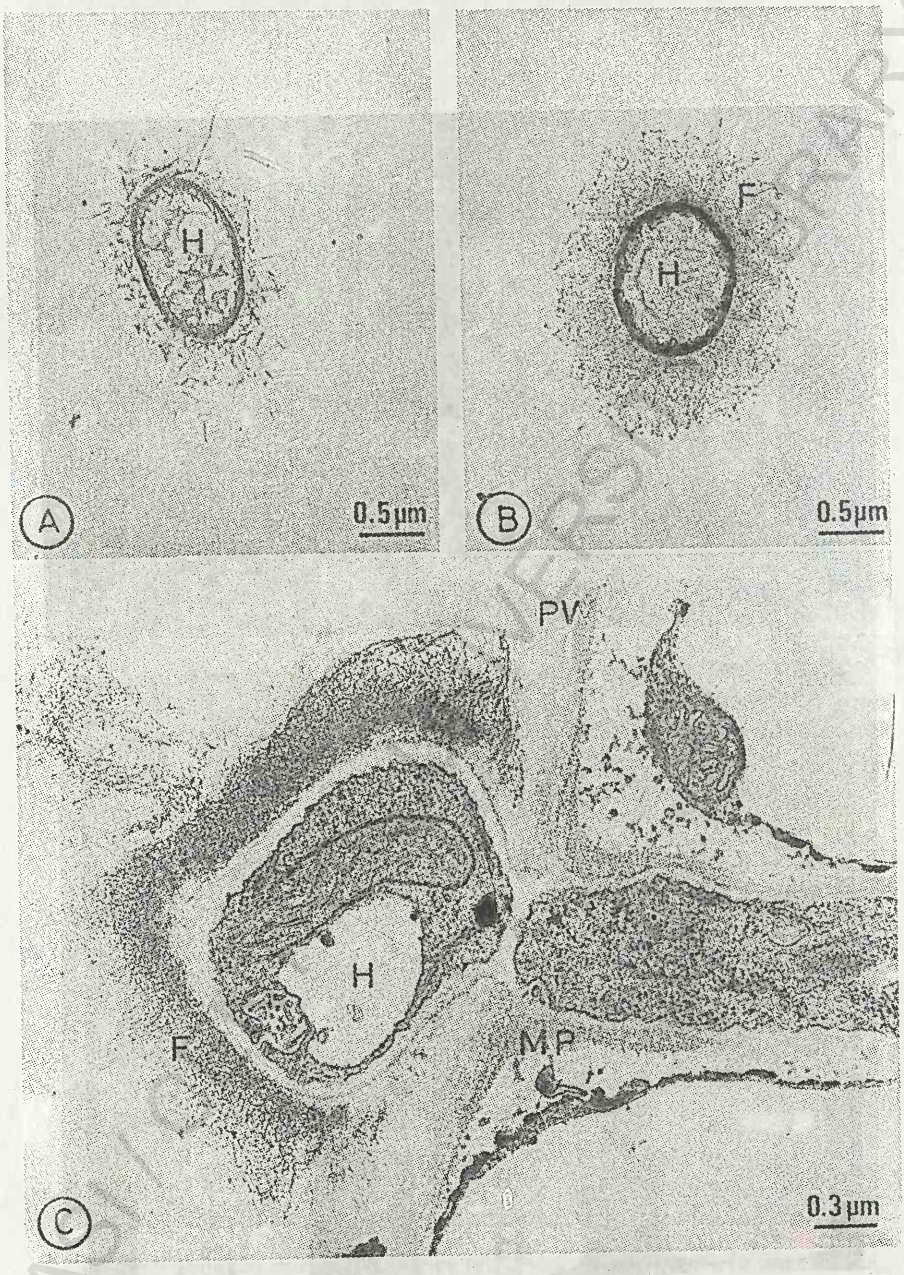


Planşa 16 – Parte din sistemul radicular de la *Fagus sylvatica* dezvoltat în humusul unui sol de pădure. Axul principal, îngroşat secundar, prezintă ramificaţii complet acoperite de o teacă de hife fungice. La rîndul lor, acestea prezintă ramificaţii acoperite de miceliul fungic (după Harley, 1984).

BCU IASI LIBRARY

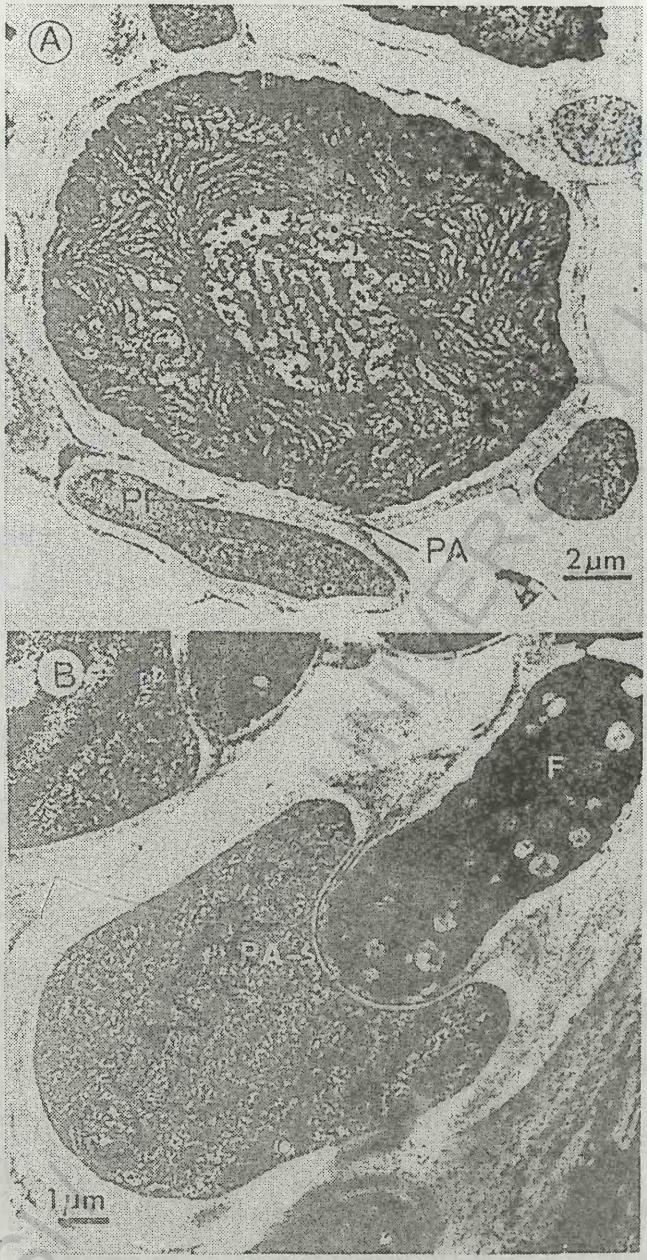



Planșa 17 – Ectomicorizele la *Pinus sylvestris* (sus). Fiecare tip morfologic este format de o specie fungică diferită (după Gerdermann, 1971). Jos – Efectul inoculării solului de pajiște cu fungi de micorize asupra dezvoltării plantelor de *Pinus radiata*. **A.** Dezvoltarea în sol de tip lut-prăfos. **B, C.** Dezvoltarea în soluri similare după adăugarea de sol de pădure (0,2%) provenit din orizontul $A_1$ (după Wilde și Lafond, 1967).



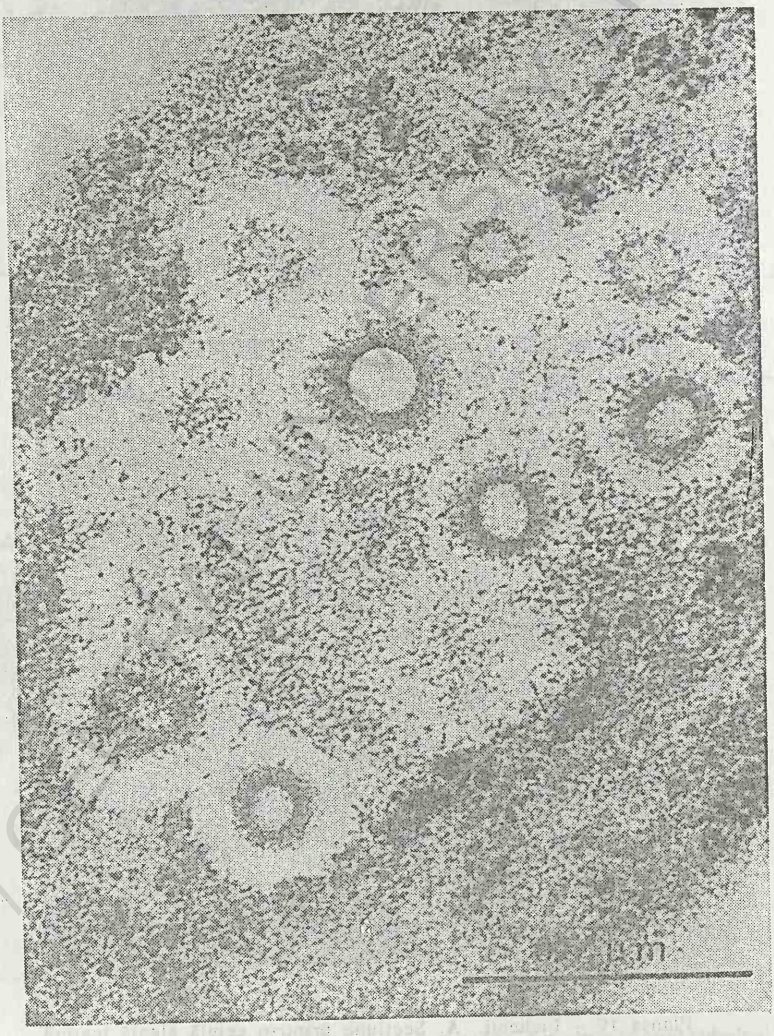

Planșa 18 – Micorize. Hife de *Pezizella ericae* (H) cultivate în agar (**A**), dezvoltate în jurul rădăcinii de la *Vaccinium corymbosum* (**B**) și pătrunzînd în celula-gazdă după legarea de rădăcinile de *Calluna vulgaris* (**C**): F – teacă de fibrile extracelulare: PV – peretele celulei vegetale;MP – material parietal al acesteia (după Gianinozzi, Pearson, Bonfante-Fasolo și Dexheimer, 1986).

BCU



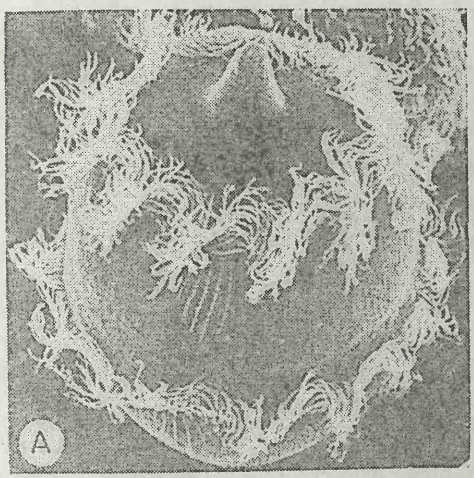

Planşa 19 – Lichenii. **A.** Secţiune printr-o celulă algală matură *(Caloplaca erythrocarpa),* înconjurată de hife fungice adiacente (după Gallun şi Bubrick, 1984). **B.** Secţiune printr-o celulă de *Gonohymenia mesopotamica,* invadată de hife fungice: F – fungi; PA – perete algal; PF – perete fungic (după Paran şi colab., 1981).

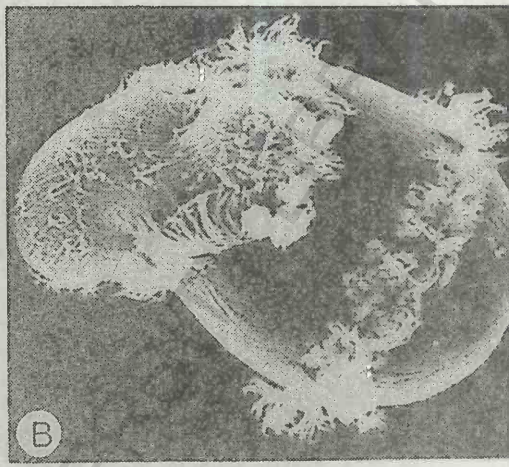
BCU IAŞI LIBRARY



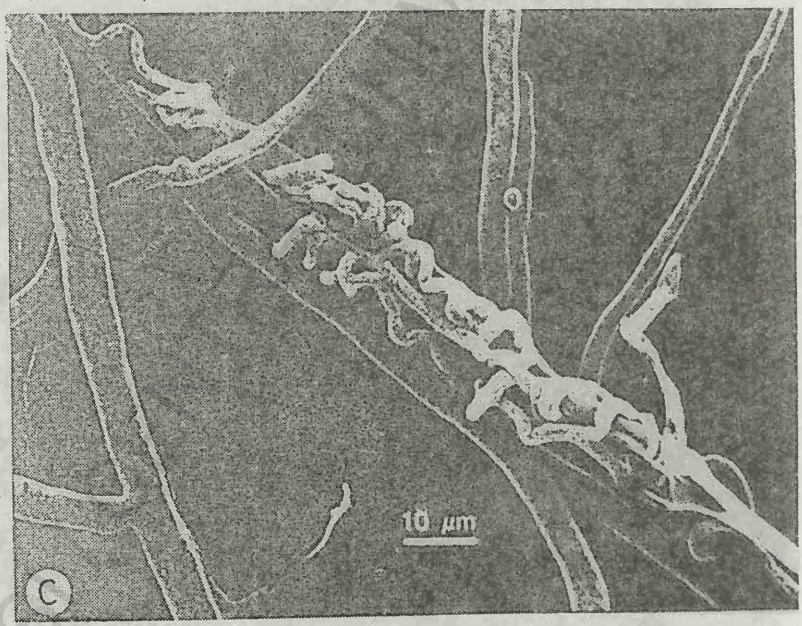
Planșa 20 – Lichenii. Aspectul corpilor concentrici (după Gallun și Bubrick, 1984).

BCU IASI / LIBRARY

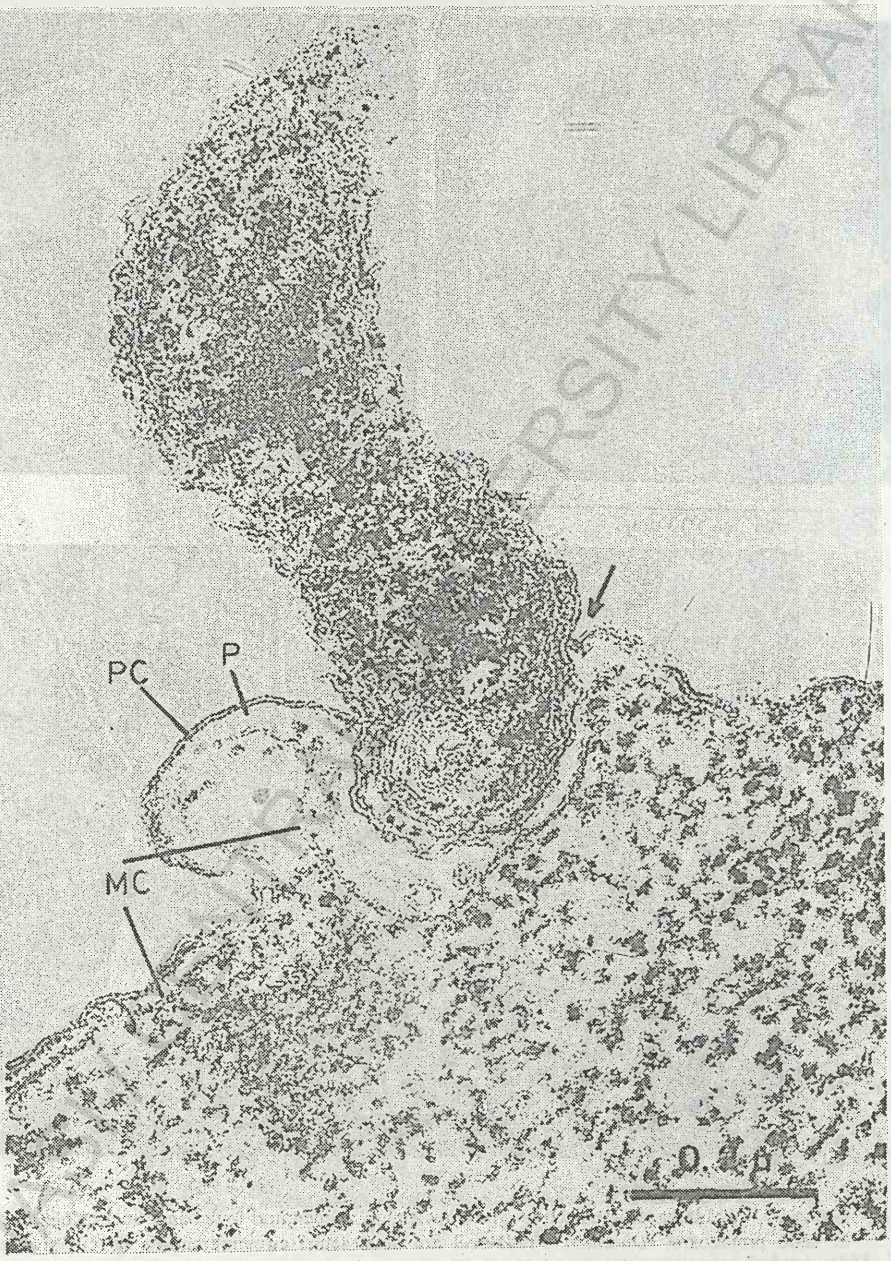



100 µm

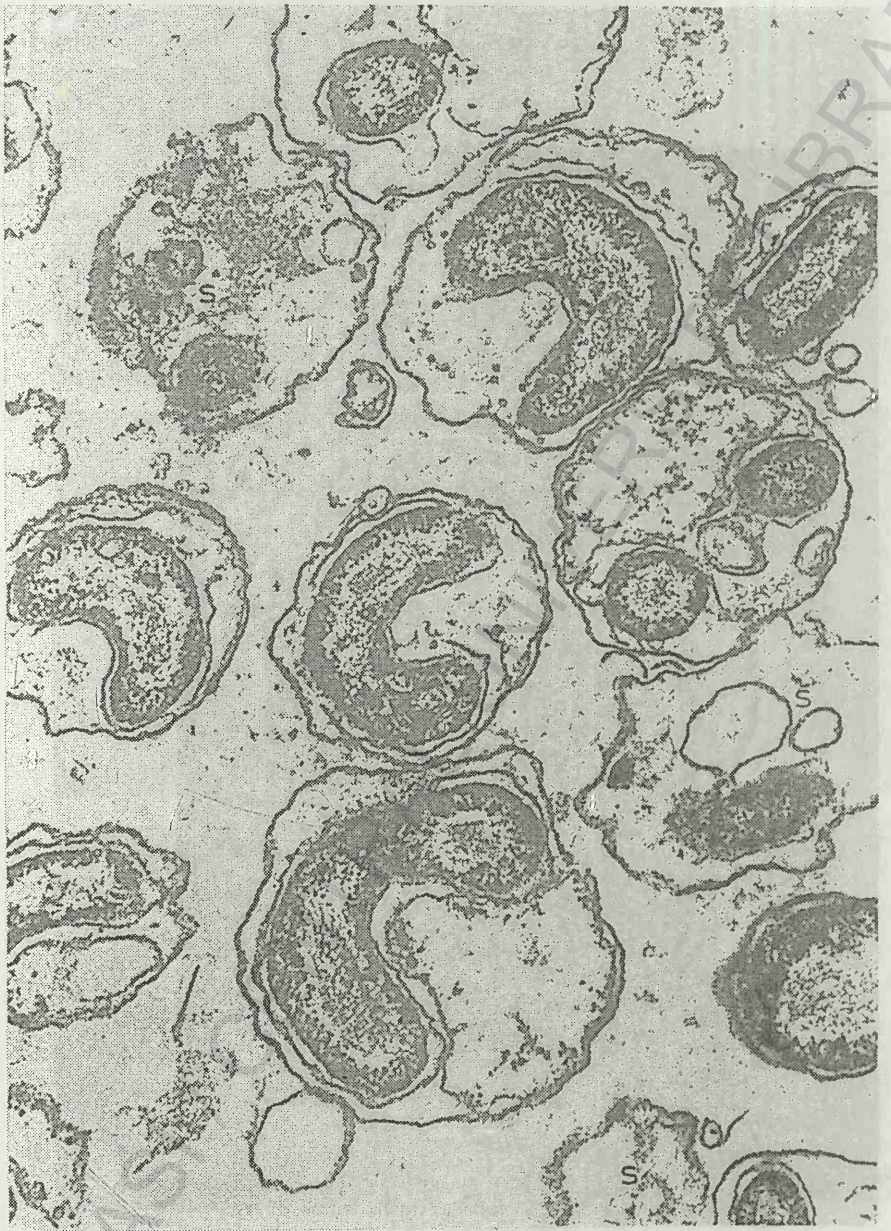



Planșa 21 – Prădarea. Microelectronografie (scanning) evidențiind înglobarea unei celule de *Parameciu* de către protozoarul *Didinium*. Prădătorul are două seturi circumferențiale de cili și o protuberanț asemănătoare unui tub, cu ajutorul căreia capturează prada (A, B) (după Barlow, 1983) C. Micoparazitismul. Hifele fungilor prădători se răsucesc în jurul hifelor mai groase ale unor fungi parazi (după Elad, Barak și Chet, 1983).



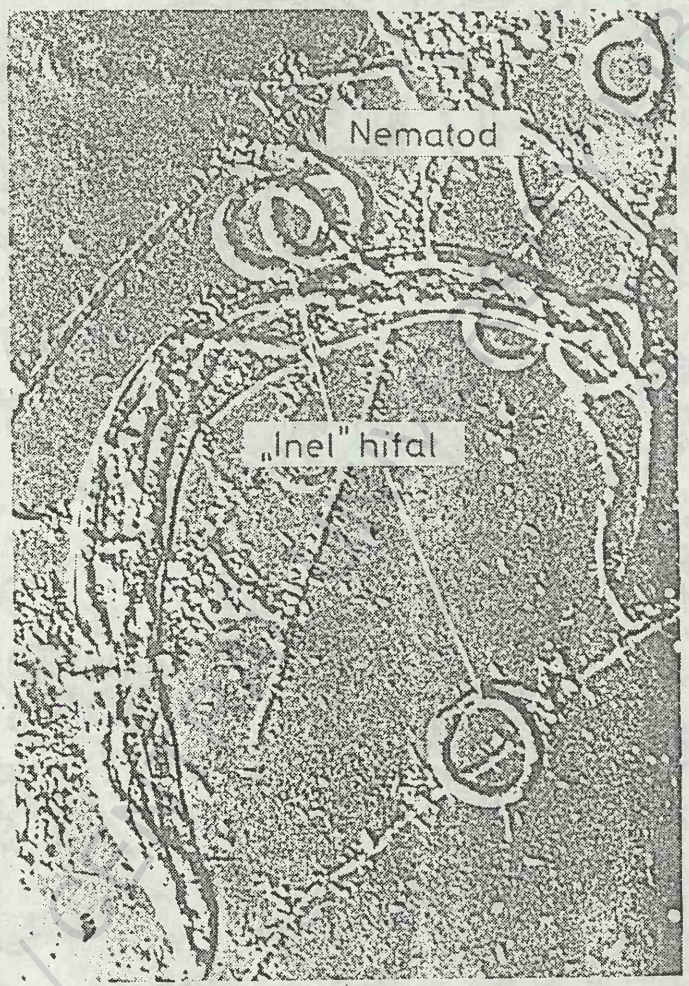

Planşa 22 – *Bdellovibrio bacteriovorus.* Secţiune ultrafină evidenţiind stadiul de pătrundere a parazitului prin peretele celulei-gazdă (PC): MC – membrana citoplasmatică; P – spaţiul periplasmatic (după Burnham, Hashimoto şi Conti, 1968).

BCU ... ERSITY LIBRARY




Planşa 23 – *Bdellovibrio bacteriovorus.* Microelectronografia unor celule dezvoltate în interiorul bacteriei parazitate *Erwinia amylovora:* S – sferoplaşti de *E. amylovora* rămaşi după dezorganizarea conţinutului celular, consecutivă infecţiei cu *B. bacteriovorus,* sub acţiunea enzimelor acestuia sau prin procese autolitice (după Starr şi Baigent, 1966).

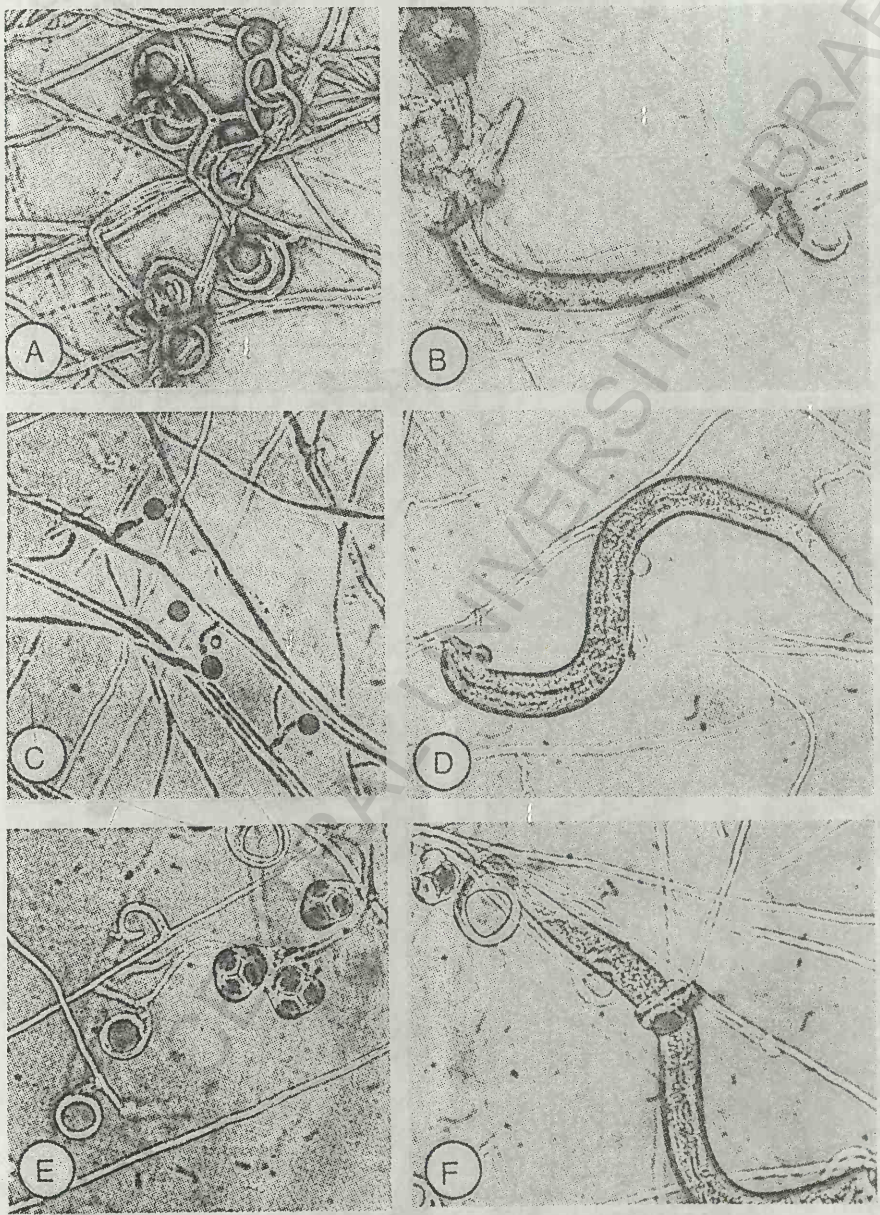
BCU CLUJ LIBRARY




Planşa 24 – *Fungii nematofagi.* Hifele circulare de la *Arthrobotrys anchonic* capturează şi imobilizează nematodele (după Barron, 1977).

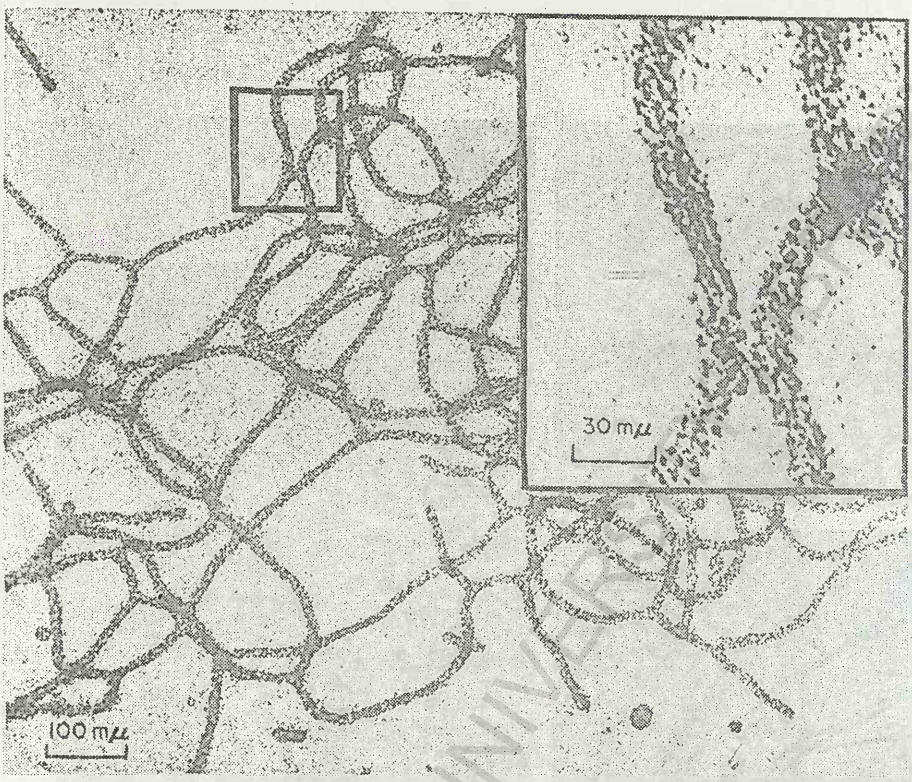
BCU IASI / LIBRARY

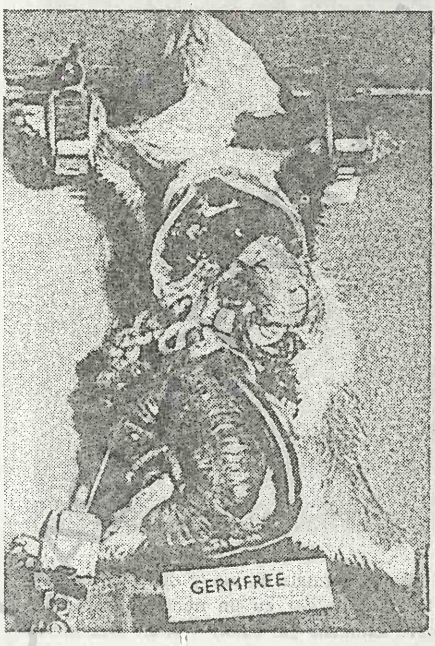
B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIO...

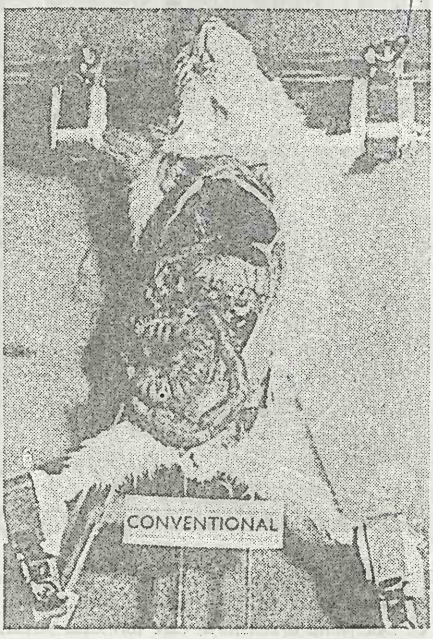



Planșa 25 – *Fungii nematofagi.* **A.** Capcane inelare adezive, formate de hifele de *Arthrobotrys conoides,* care prind nematodele ca într-un laț. **B.** *A. conoides* cu un nematod capturat. **C.** *Dactylella drechslerii,* care formează structuri adezive terminate „în buton" **D.** *D. drechslerii* cu un nematod capturat. **E.** *Arthrobotrys dactyloides* formează capcane inelare alcătuite din trei celule, care capturează prin ocluzie. **F.** *A. dactyloides* cu un nematod capturat (după Pramer, 1964).

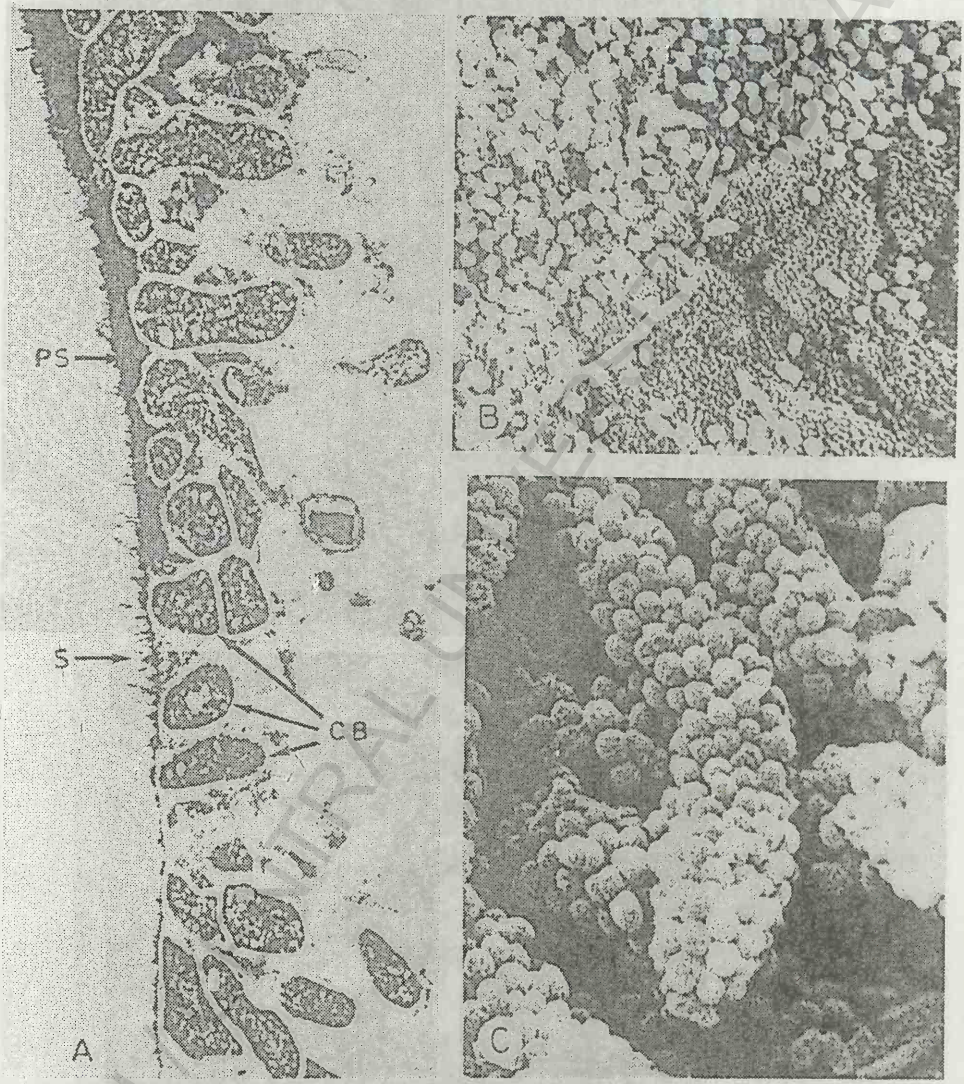
BCU IAȘI - UNIVERSITY LIBRARY



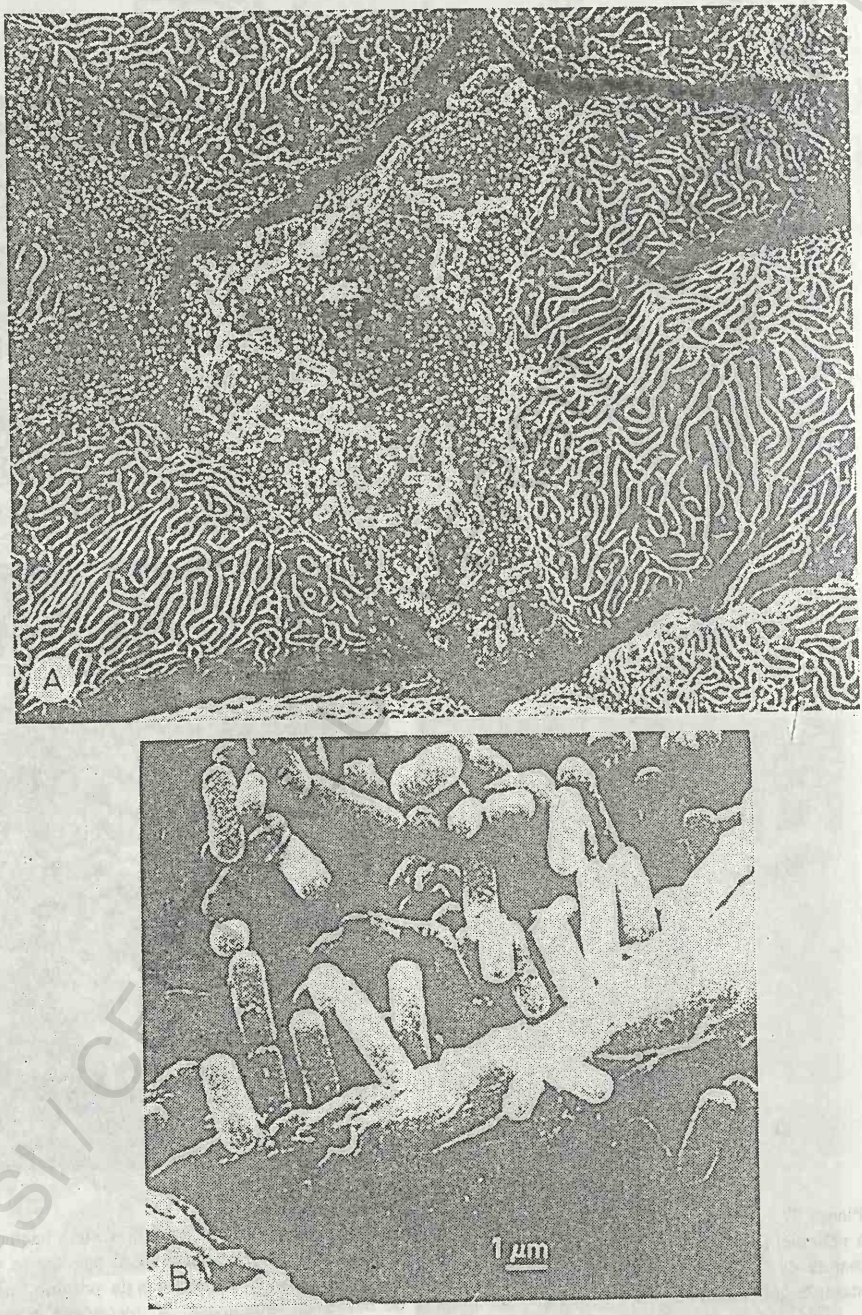




Planșa 26 – Microelectronografia lipopolizaharidului de la *Salmonella typhimurium,* după colorare cu acetat de uranil (sus) (după Shands jr., Graham și Nath, 1967). Jos – Aspectul comparativ al intestinelor și, în particular, al cecum-ului la un animal germ-free și la altul convențional (după Wynngate, Horton și Forbes, 1959).




Planşa 27 – Placa dentară. Aspectul stadiului timpuriu de formare, evidenţiind colonizarea bacteriană (CB) a peliculei salivare (PS) ce acoperă smalţul (A). B. Aranjarea bacteriilor coccoide şi bacilare în monostrat, înainte de formarea agregatelor bacteriene. C. Aspectul structurilor în „ştiulete de porumb" rezultat din ataşarea celulelor coccoide *Streptococcus sanguis* de bacteria filamentoasă *Bacterionema matruchotri* în placa dentară umană (după Nikiforuk, 1985).

BCU Iași - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

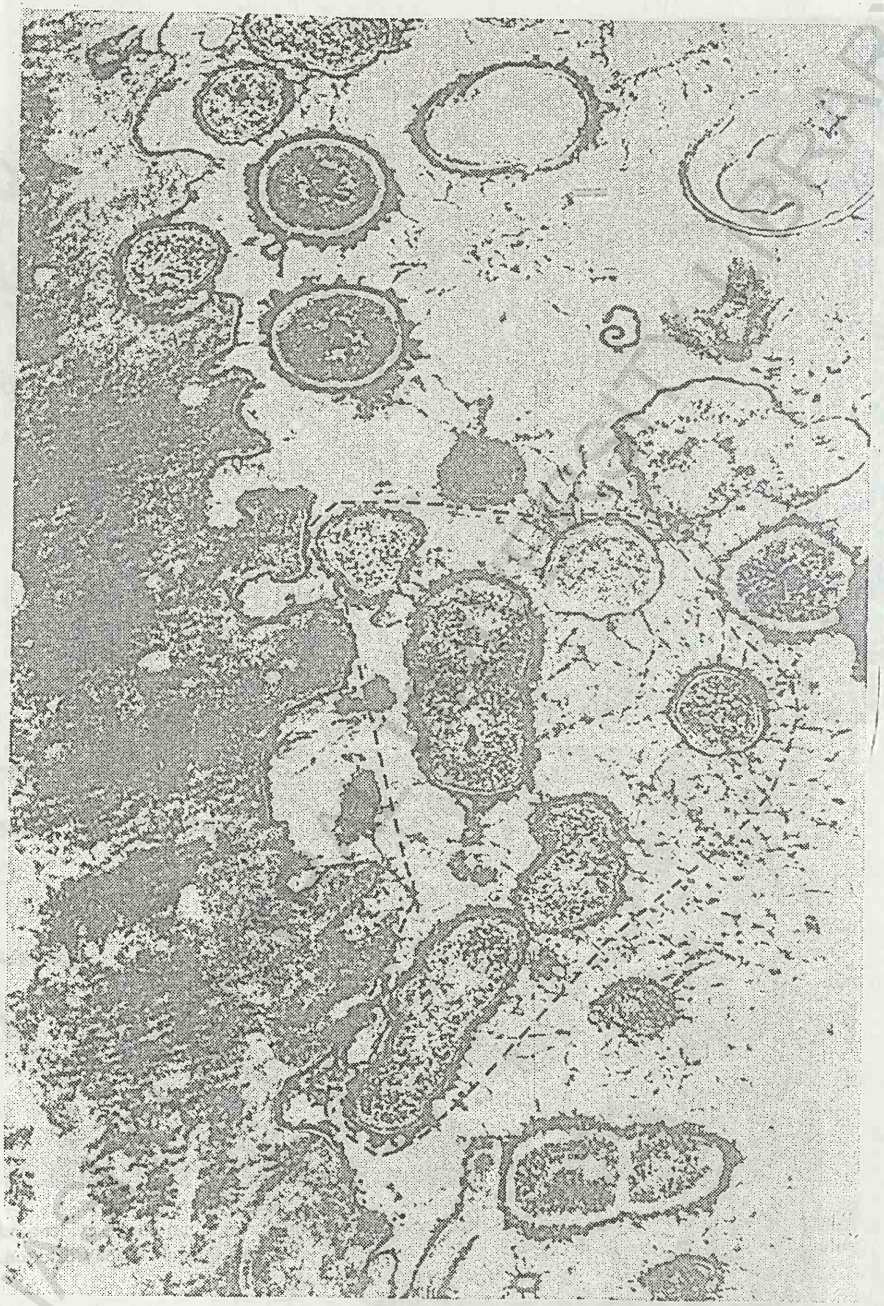



Planșa 28 – Celule de *Escherichia coli* aderente de suprafața mucoasei căilor urinare, legate selectiv, prin intermediul fimbriilor de anumite glucide de suprafață (A). B. Bacterii cilindrice aderente de suprafața epitelială a sistemului gastrointestinal de la șoarecele adult (după Savage și Blumershine, 1974).

BCU IASI / CE

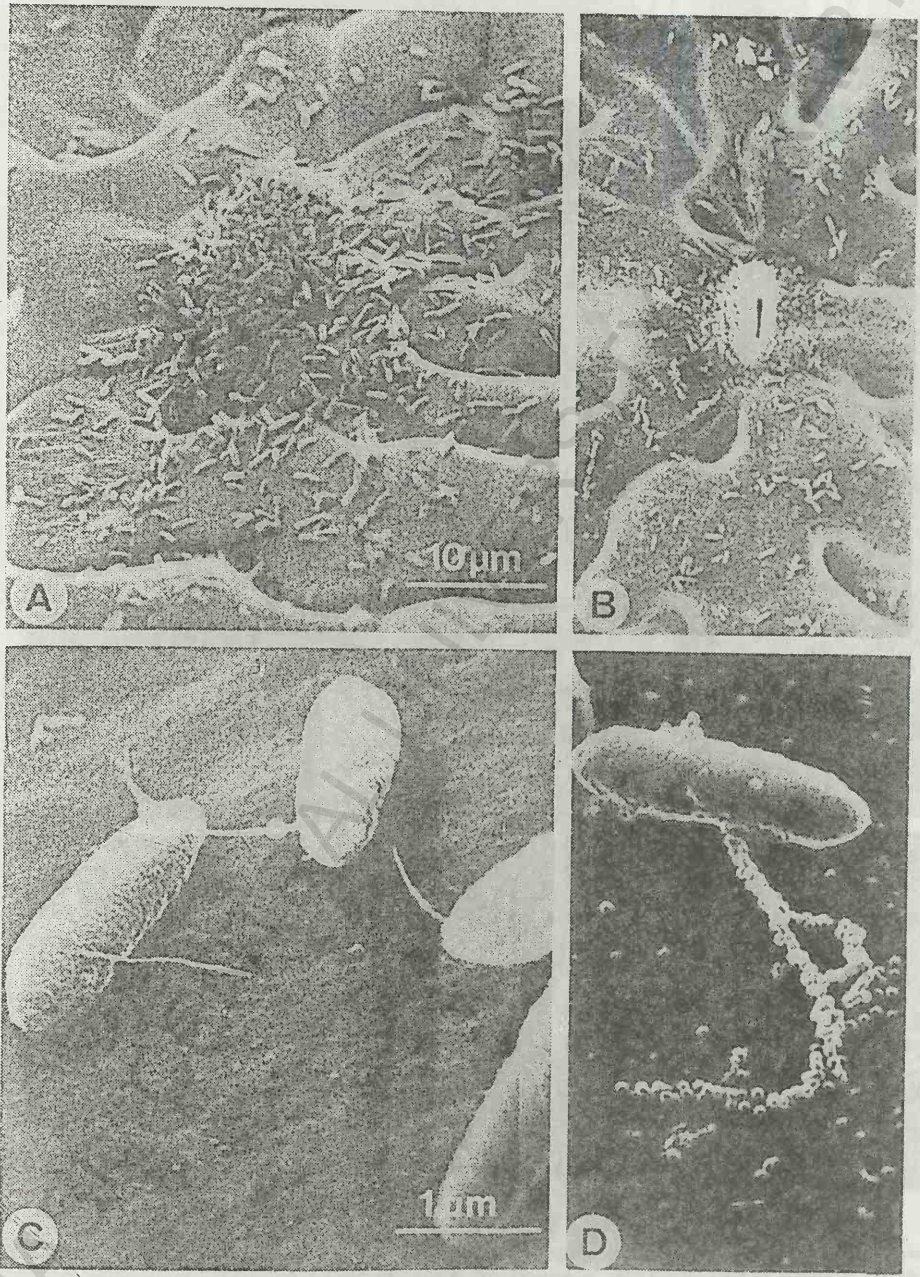
Planşa 29 – Adeziunea dintre bacterii în faza lichidă a conţinutului ruminal bovin, evidenţiind rolul structurilor fibrilare ale glicocalixului în interacţiunile fizice dintre celule (după Costerton, Irvin şi Cheng, 1981).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

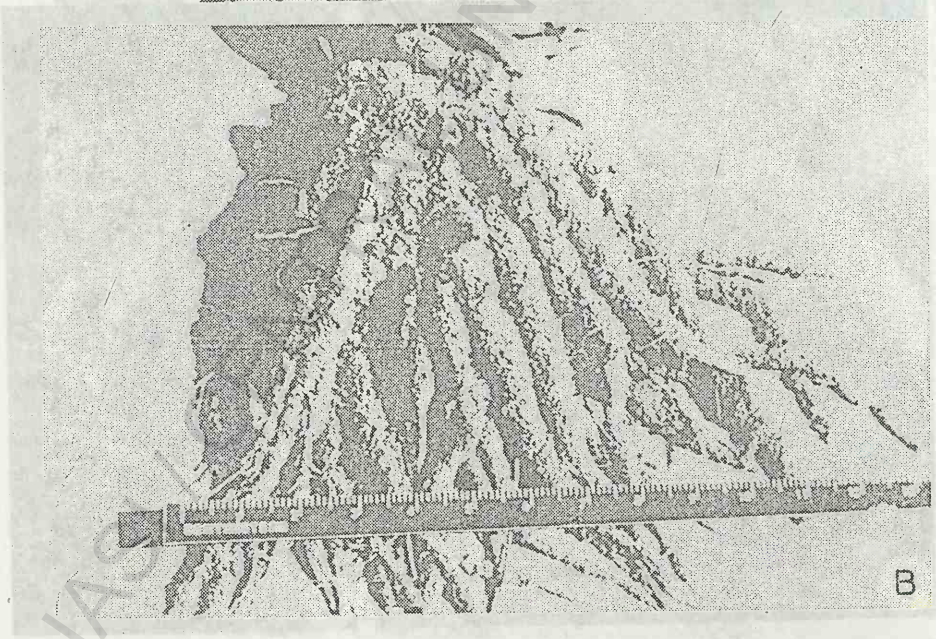


Planşa 30 – Microelectronografia unei secţiuni printr-o frunză din furaje incubată în contact cu bacterii din rumen. Eliberarea substanţelor vegetale solubile în spaţiile intercelulare ale frunzei, favorizează dezvoltarea microcoloniilor bacteriene: bara = 0,1 μm (după Costerton, Irvin şi Cheng, 1981).

BCU

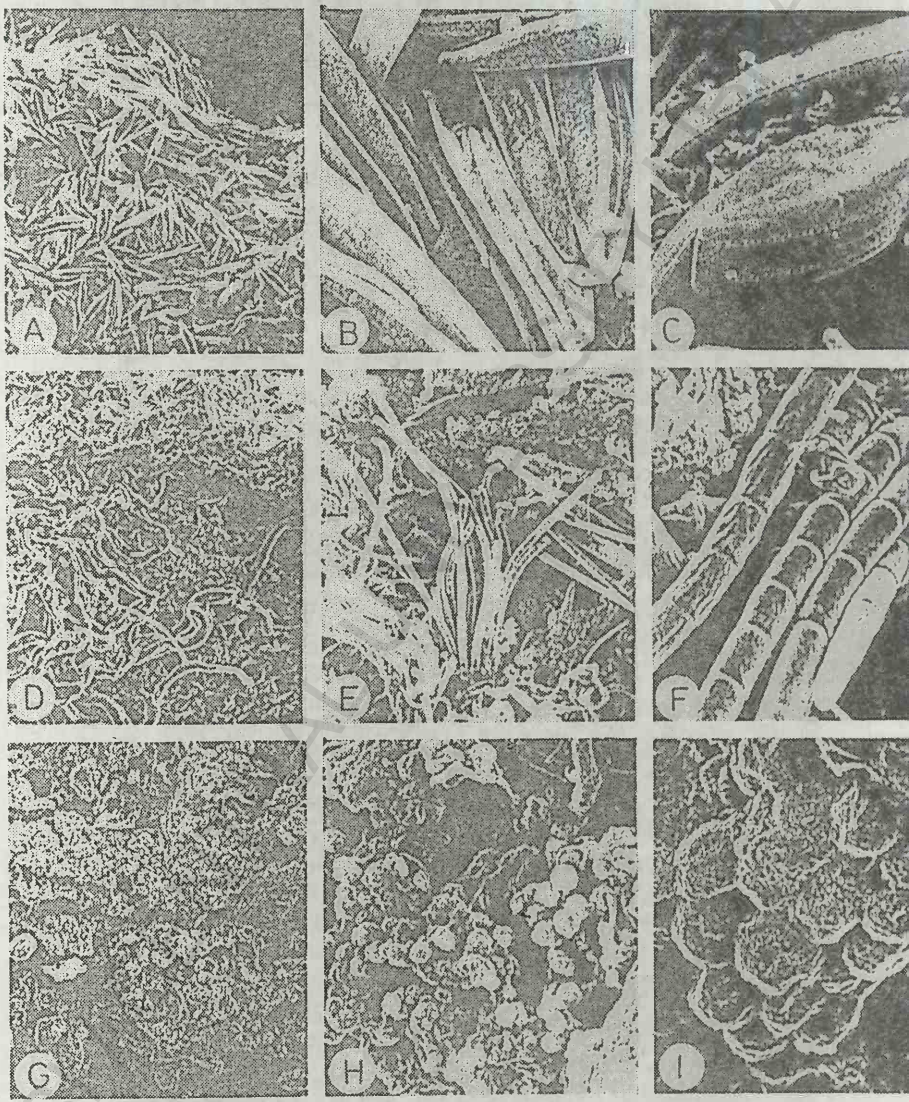



Planșa 31 – Rolul fimbriilor în adeziunea bacteriei *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* pe frunzele de *Phaseolus vulgaris*. A. Adeziunea celulei fimbriate de o stomată. B. Celule nefimbriate dispersate (neaderente). C. Celule fimbriate aderente pe o frunză, D. Bacterie cu pilul marcat cu fagul ϕ 6 (după Horkhonen și colab., 1986).



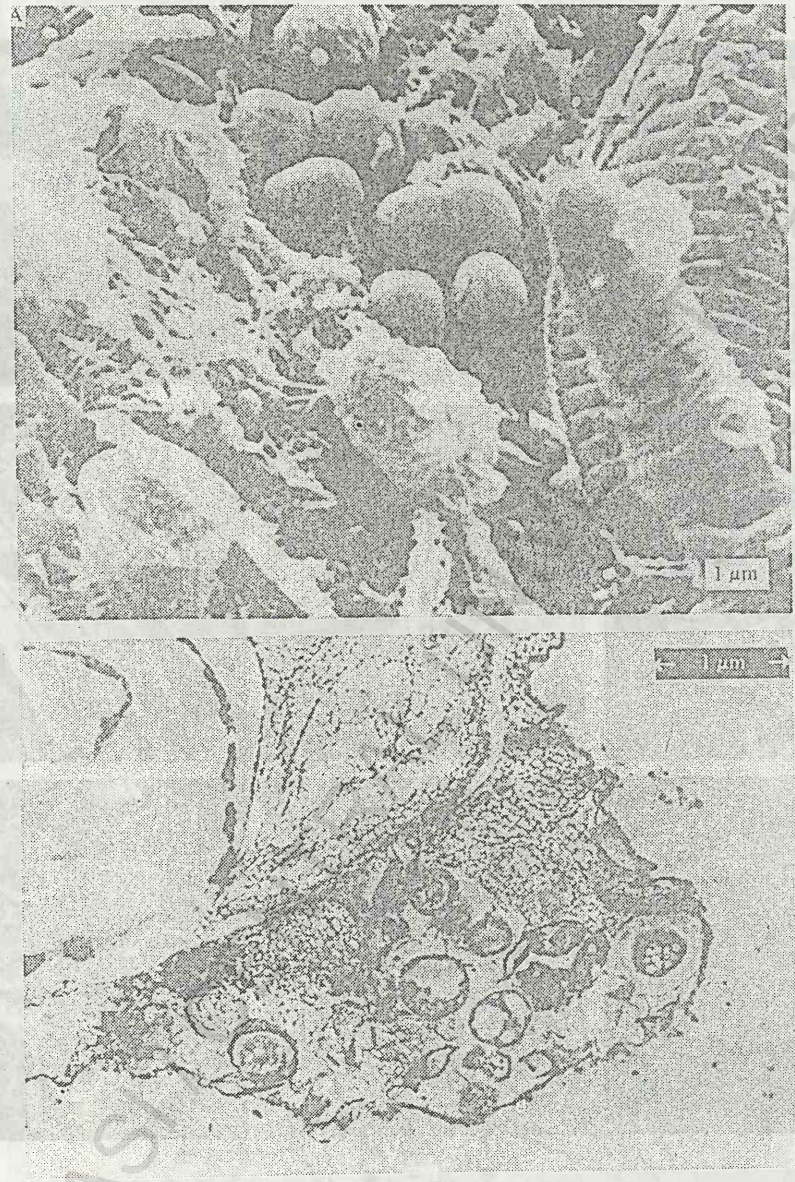

Planșa 32 – Fotografia sistemului radicular al unei plante, evidențiind perii radiculari și particulele de sol legate de rizoplan (A). B. Rizoteaca la *Secale cereale*. Diametrul cilindrilor de sol este de aproximativ 8 mm (după Duell, 1987).

BCU IAȘI LIBRARY



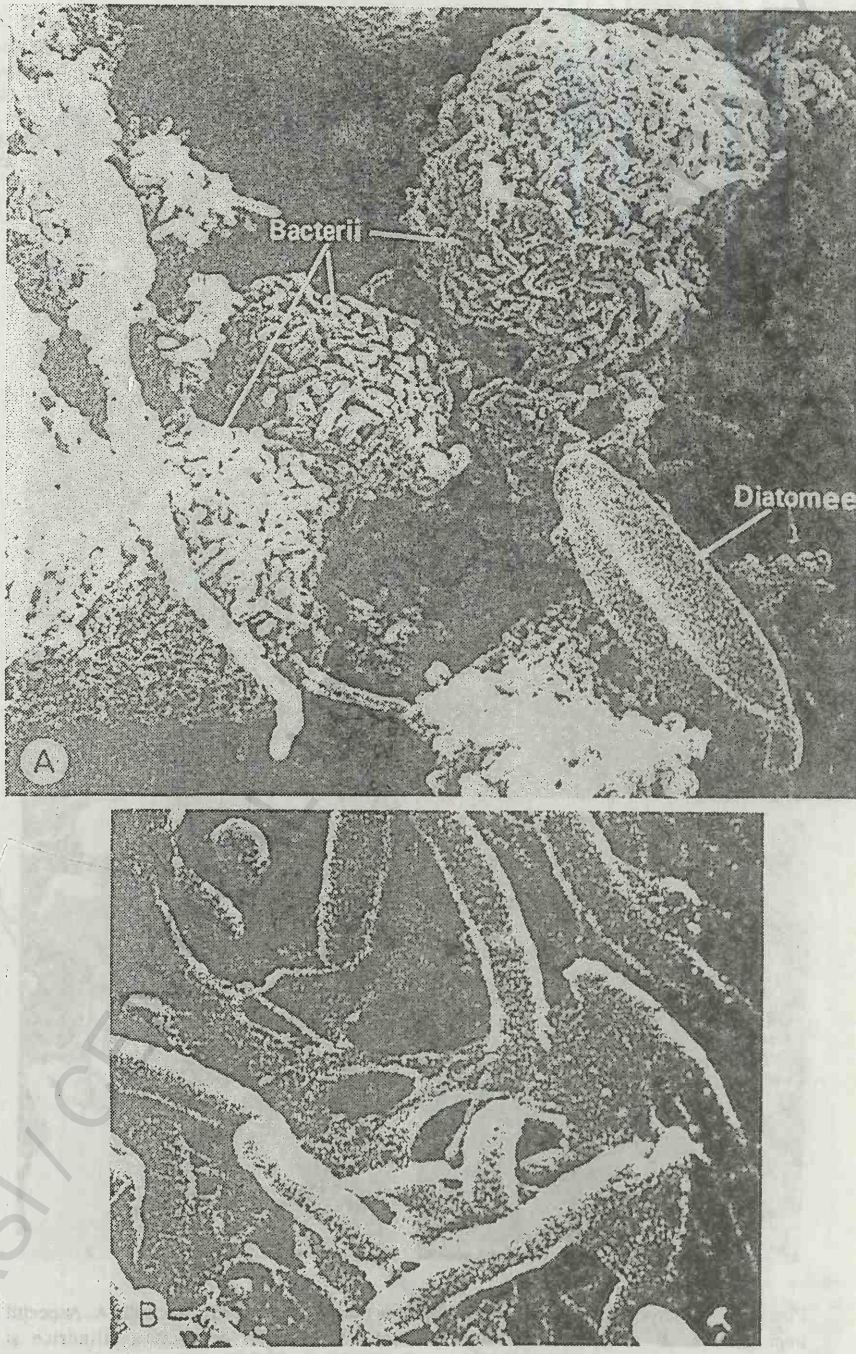

Planşa 33 – Microorganismele dominante în comunităţile stratificate ce formează împîsliri laminate ver
în mediile acvatice (delta rîului Ebru). **A, B, C.** Diatomee. **D, E, F.** Cianobacterii filamento
**G, H, I.** Bacterii fototrofe anoxigenice. Microelectronografie (scanning, după Mir şi Esteve, 19

BCU IASI



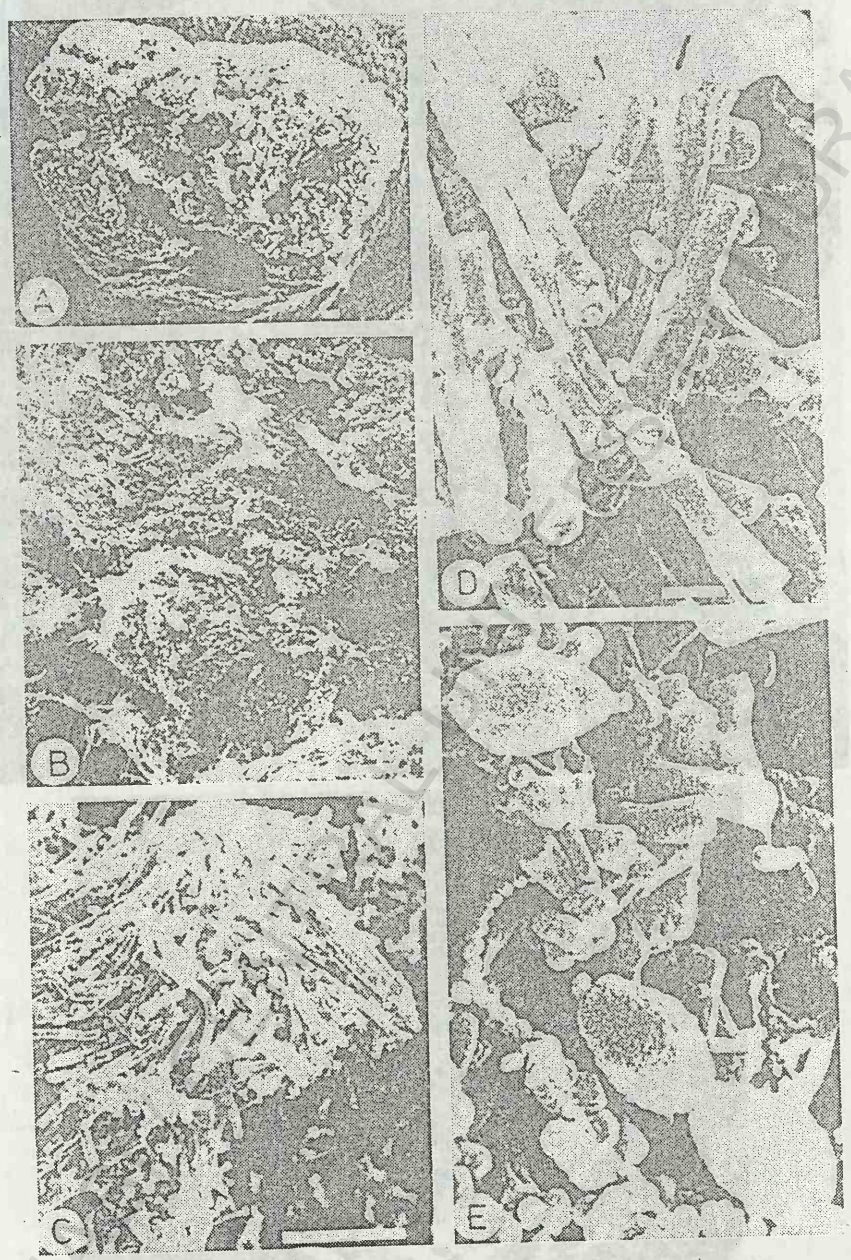

Planşa 34 – Microbiota detritică depusă pe un ac de pin, incubat timp de 5 săptămîni în apele unui estuar (Apalachicola Bay) (sus) (după White, 1979). Jos – Microelectronografia unei secţiuni fine printr-o microcolonie bacteriană ataşate de frustula unei diatomee (după Moriarty şi Hayward, 1982).

BCU CLUJ LIBRARY



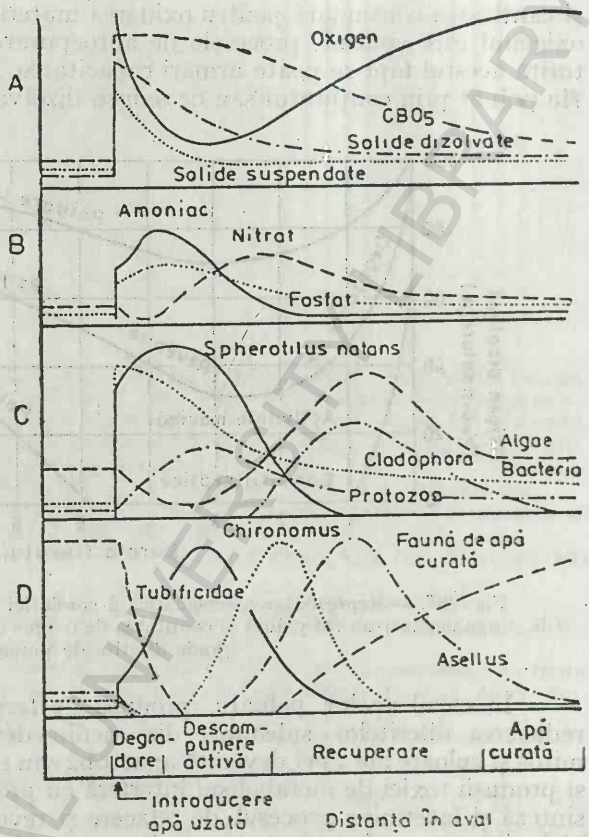

Planșa 35 – Biofilm microbian dezvoltat pe suprafața constituenților unui filtru percolator **(A)** (după Mack, Mack și Ackerson, 1975). **B.** Bacterii prezente într-un flocon de nămol activat (după Tago și Aida, 1977).

BCU IASI / CT




Planşa 36 – Microelectronografia (scanning) unui nămol cu structură granulară. **A.** Aspectul unei granule. **B.** Structura suprafeţei granulei. **C.** Agregat de bacterii cilindrice şi filamentoase. **D.** Agregat de scurte filamente multicelulare. **E.** Diferite tipuri morfologice de microorganisme de pe suprafaţa granulelor: barele din A şi B au 100 µm, cea din C = 10 µm, iar cele din D şi E = 1 µm (după Adamse, Deinema şi Zhner, 1984).

Fig. 385. — Reprezentarea schematică a efectelor deversării unui efluent, conținînd substanțe organice într-un riu și a modificărilor apărute în aval. **A.** și **B.** Modificări fizice și chimice. **C.** Modificări în structura microbiotei. **D.** Modificări în fauna de nevertebrate (din Warren, 1971).



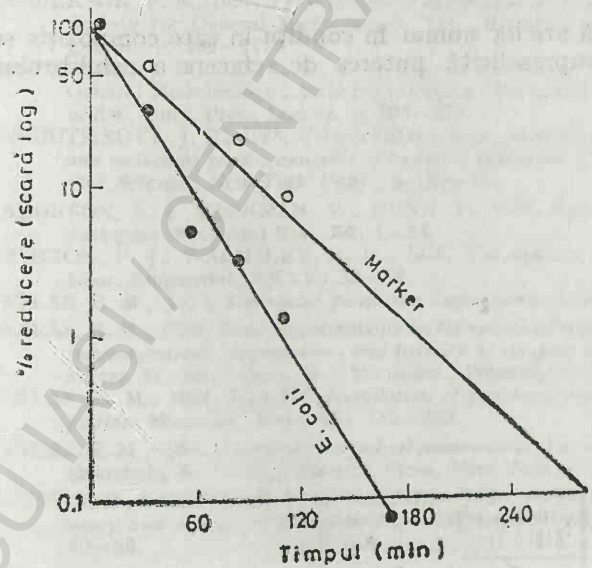




Fig. 386. — Reprezentarea schematică a vitezei de îndepărtare a bacteriei *Escherichia coli* din apă comparativ cu un marker cu proprietăți fizice asemănătoare (scală semilogaritmică) (după Bunde, 1977).



BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

și cantitatea consumată pentru oxidarea materiei organice, pe de alta. Cînd oxigenul este epuizat, procesele de autoepurare diminuă considerabil. Datorită acestui fapt se poate urmări capacitatea de revenire la normal a unui rîu poluat prin conținutul său de oxigen dizolvat (fig. 387).

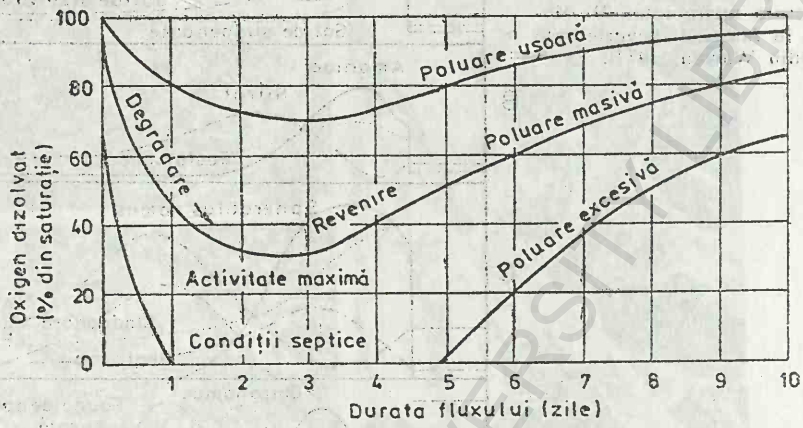



Fig. 387. — Reprezentarea schematică a corelației dintre degradarea materiei organice într-un rîu poluat și cantitatea de oxigen dizolvat, în condițiile a trei grade diferite de poluare.

În cazul apelor poluate, produșii de fermentație și cei rezultați din reducerea diferitelor substanțe din mediu determină modificări de gust, miros și culoare ale apei devenită anaerobă sau septică. Turbiditatea crescută și produșii toxici de metabolism interferă cu producerea de oxigen prin fotosinteză și încetinesc procesul de refacere și revenire la normal. Diversitatea biologică este mult redusă, iar unele specii obligat aerobe (microorganisme, nevertebrate, pești) dispar.

Autoepurarea naturală are loc numai în condiții în care compoziția și cantitatea poluanților nu suprasolicită puterea de refacere a echilibrului bazinului natural.

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY
Cota veche 5000 lei

# BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ


AARONSON, S., 1970, *Experimental microbial ecology*. Academic Press, New York, Londra.

ADAMSE, A., DEINEMA, M. H., ZEHNER, A.J.B., 1984, *Studies on bacterial activities in aerobic and anaerobic waste water purification*. Antonie van Leeuwenhoek, **50**: 665—682.

ADLER, E., 1977, *Lignin chemistry Past, present and future*. Wood Sci. Technol., **11**: 169—218.

AHMADJIAN, V., 1965, *Lichens*. Ann. Rev. Microbiol., **19**: 1—20.

AHMADJIAN, V., HALE, M. E., 1973, *The Lichens*. Academic Press, New York, Londra.

ALBERT, M. J., MATHAN, V. I., BAKER, S. J., 1980, *Vitamin $B_{12}$ synthesis by human small intestine bacteria*. Nature (Londra), **283**: 781—782.

ALEXANDER, M., 1964, *Biochemical ecology of soil microorganisms*. Ann. Rev. Microbiol., **18**: 217—252.

ALEXANDER, M., 1971, *Microbial Ecology*. John Wiley and Sons Inc., New York.

ALEXANDER, M., 1978, *What for science, what for society*. În: *Microbial ecology* (Loutit, M.W., Miles, J. A. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 2—6.

ALEXANDER, M., 1980, *Helpful, harmful, and fallible microorganisms : importance in transformation of chemical pollutants*. În: *Microbiology* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington DC, p. 328—332.

ALEXANDER, M., 1980, *Biodegradation of chemicals of environmental concern*. Science (S.U.A), **211**: 132—138.

ALLEN, R. D., 1962, *Amoeboid movement*. Sci. Amer., **182**: 2—9.

ALLWEIS, B., DOSTAL, J., CAREY, K. E., EDWARDS, T. F., FRETER, R., 1977, *The role of chemotaxis in the ecology of bacterial pathogenes of mucosal surface*. Nature (Londra), **260**: 448—450.

ANDERSON, E. S., 1957, *The relations of bacteriophages to bacterial ecology*. Symposium of the Society for General Microbiology, VII „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 189—217.

ANDERSON, J D., COX, C. S., 1967, *Microbial survival*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J.L., eds.). Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 203—226.

ARBUTHNOTT, J. P., 1988, *Extracellular toxins : their role in virulence*. În: *Immunochemical and molecular genetic analysis of bacterial pathogens* (Owen, P., Foster, T. J., eds.). Elsevier Science, New York Pnbl., p. 45—55.

ARONSON, A. I., BECKMAN, W., DUNN, P., 1986, *Bacillus thuringiensis and related insect pathogens*. Microbiol Rev., **50**: 1—24.

ASHTON, P. J., WALMSLEY, R. D., 1976, *The aquatic fern Azolla and its Anabaena symbiont*. Endeavour, XXXV: 39—34.

ATLAS, R. M., 1977, *Stimulated petroleum degradation*. C. R. Microbiol., **5**: 371—386.

ATLAS, R. M., 1980, *Some considerations on the microbial transformations of organic pollutants : microorganisms, degradation, and toxicity of complex mixtures*. În: *Microbiology* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 339—340.

ATLAS, R. M., 1981, *Microbiol degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective*. Microbiol. Rev., **45**: 180—209.

ATLAS, R. M., 1984, *Diversity of microbial communities*. În: *Advances in microbial ecology*, vol. 7 (Marshall, K. C., ed.). Plenum Press, New York, p. 1—47.

AUSTIN, B., CALOMIRIS, J. J., WALKER, J. D., COLWELL, R. R., 1977, *Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria*. Appl. and Environm. Microbiol., **34**: 60—68.

AUSUBEL, F. M., 1986, *Biological nitrogen fixation : recent advances and future prospects.* Regulat. Toxicol. Pharmacol., **6**: 1—10.

AVGERINOS, G. C., WANG, D.I.C., 1980, *Direct microbiological conversion of cellulosis to ethanol.* Ann. Rev. Ferm. Processes, **4**: 165—191.

BABICH, H., STOTZKY, G., 1978, *Atmospheric pollution : impacts on and interactions with microbial ecology.* În : *Microbial ecology* (Lotutit M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 13—17.

BAILEY, P. J., LIESE, W., RÖSEN, R., 1968, *Some aspects of cellulose degradation in lignified cell walls.* În : *Biodeterioration of materials. Microbiological and allied aspects* (Walters, A. H., Elphick, J. J., eds.). Elsevier Publ. Co. Ltd., Londra, p. 546—578.

BAKER, J. M., 1963, *Ambrosia beetles and their fungi with particular reference to Platypus cylindrus Fab.* Symposia of the Society for General Microbiology. XIII „Symbiotic associations". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 232—265.

BAKER, K. F., 1980, *Microbial antagonism. The potential for biological control.* În : *Contemporary microbial ecology* (Ellwood, D. C., Hedger, J. N., Latham, M. J., Lynch, J. M., Slater, J. H., eds.). Acad. Press, Londra, p. 327—347.

BAL, K. A., SHANTHARAM, D., RATNAM, S., 1978, *Ultrastructure of Rhizobium japonicum in relation to its attachment to root hairs.* J. Bacteriol., **133**: 1 393—1 400.

BALKWILL, D. L., CASIDA, Jr. L. E., 1973, *Microflora of soil as viewed by freeze-etching.* J. Bacteriol., **114**: 1 319—1 327.

BALKWILL, D. L., MARATEA, D., BLAKEMORE, R. P., 1980, *Ultrastructure of a magnetotactic spirillum.* J. Bacteriol., **141**: 1 399—1 408.

BANDONI, R. J., KOSKE, R. E., 1974, *Monolayers and microbial dispersal.* Science (S.U.A) **183**: 1 079 — 1 080.

BARNETT, H. L., 1963, *The nature of mycoparasitism by fungi.* Ann. Rev. Microbiol., **17**: 1—14.

BARNETT, H. L., 1964, *Mycoparasitism.* Mycologia, LVI, 1—19.

BAROSS, J. A., DEMING, J. W., 1983, *Growth of „black smoker" bacteria at temperatures at least 250°C.* Nature (Londra), **303**: 423—426.

BARTHOLOMEW, G. W., ALEXANDER, M., 1981, *Soil as a sink for atmospheric carbon monoxide.* Science (S.U.A), **212**: 1 389 — 1 391.

BARZIC, M. R., 1985, *Les toxines des bacteries phytopathogènes.* Bull. Inst. Pasteur, **83**:245—287.

BAUMANN, P., BAUMANN, L., BOWDITCH, R. D., BROADWELL, A. H., 1987, *Cloning of the gene for the larvicidal toxin of Bacillus sphaericus 2 362 : evidence for a family of related sequences.* J. Bacteriol., **169**, 4 061—4 067.

BATRA, S. W. T., BATRA, L. R., 1967, *The fungus gardens of insects.* Sci. Amer., **217**: 112—120.

BAWDEN, F. C., 1957, *The role of plant host in microbial ecology.* Symposium of the Society for General Microbiology. VII „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 299—313.

BAXBY, P., GRAY, T.R.G., 1968, *Chitin decomposition in soil. I. Media for isolation of chitinoclastic microorganisms from soils.* Trans. Br. Mycol. Soc., **51**: 287—292.

BECHTEL, D. B., BULLA, Jr. L. A., 1976, *Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in Bacillus thuringiensis.* J. Bacteriol., **127**: 1 472 — 1 481.

BÉGUIN, P., 1990, *Molecular biology of cellulose degradation.* Ann. Rev. Microbiol., **44**: 219—248.

BELSER, L. W., 1979, *Population ecology of nitrifying bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., **33**: 309—333.

BERG, G., 1973, *Removal of viruses from sewage, effluents and waters. 1. A review.* Bull. Wld. Hlth. Org., **49**: 451—460.

BERG, G., 1973, *Removal of viruses from sewage, effluents and waters. 2. Present and future trends.* Bull. Wld. Hlth. Org., **49**: 461—469.

BERG, H. C., 1975, *Chemotaxis in bacteria.* Ann. Rev. Biophisics and Bioengineering, **4**: 119—136.

BERG, H. C., 1975, *How bacteria swin.* Sci. Amer., **233**, 36—44.

BERG, H. C., TURNER, L., 1979, *Movement of microorganisms in viscous environments.* Nature (Londra), **278**: 349—351.

BERGERSEN, F. J., 1978, *Rhizobium — legume symbiosis: The intracellular environment of Rhizobium japonicum in soybean root nodules.* În : *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 370—383.

BERINGER, J. E., BREWIN, N., JOHNSTON, A. W. B., SCHULMAN, H. M., HOPWOOD, D. A., 1979, *The Rhizobium—legume symbiosis.* Proc. R. Soc. London, B, **204**:219—233,

BERNHEIMER, A. W., 1968, *Cytolytic toxins of bacterial origin*. Science (S.U.A), **159**: 847—851.
BERRY, L. J., 1975, *Bacterial toxins*. Lloydia, **38**: 8—20.
BERRY, A. M., 1987, *Cellular aspects of root nodule establishment in Frankia symbiosis*. În: *Plant—microbe interactions. Molecular and genetic perspectives*, vol.2 (Kosuge, T., Nester, E. W., eds.). Macmillan Publ. Co, New York, p. 194—214.
BERTRAND, J., 1972, *Interactions entre éléments minéraux et microorganismes du sol*. Rev. Ecol. Biol. Sol., **IX**: 349—396.
BEUTLER, B., MILSARK, I. W., CERAMI, A. C., 1985, *Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin*. Science (S.U.A), **229**: 869—887.
BEVERIDGE, T. J., 1980, *Bacterial structure and its implications in the mechanisms of infection : a short review*. Canad. J. Microbiol., **26**: 643—653.
BEVERIDGE, T. J., 1989, *Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization*. Ann. Rev. Microbiol., **43**: 147—171.
BIANCHI, M.A.G., 1980, *Polyphasic study of the microbial ecology of bacteria — phytoplankton interactions*. În: *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington DC., p. 372—376.
BISSELING, T., FRANSSEN, H., GLOUDEMANS, T., GOVERS, F., MOERMAN, M., NAP, J. P., VAN KAMMEN, A., 1986, *Nodulins involved in early stages of pea root nodule development*. În: *Recognition in microbe—plant symbiotic and pathogenic interactions* (Lugtenberg, B. ed.), Springer-Verlag, Berlin, p. 163—169.
BISWAS-HAWKES, D., DODSON, A. P.J., HARVEY, P. J., PALMER, J. M., 1987, În: *Lignin enzymic and microbial degradation* (Odier, E., ed.). Inra, Paris, p. 125—130.
BIZZINI, B., TURPIN, A., RAYNAUD, M., 1974, *Immunochimie et mécanisme d'action de la toxine tétanique*. Bull. Inst. Pasteur, **72**: 177—219.
BIZZINI, B., 1979, *Tetanus toxins*. Microbiol. Rev., **43**: 224—240.
BIZZINI, B., 1984, *Dalla biotecnologia alle tossine batteriche e agli immunomodulatori*. Boll. Ist. sieroter, milan, **63**: 1—13.
BLAKEMORE, R. P., 1975, *Magnetotactic bacteria*. Science (S.U.A), **190**: 377—379.
BLAKEMORE, R. P., FRAENKEL, R. B., 1981, *Magnetic navigation in bacteria*. Sci. Amer., **245**: 42—49.
BLAKEMORE, R. P., 1982, *Magnetotactic bacteria*. Ann. Rev. Microbiol., **36**: 217—238.
BOLIN, B., 1970, *The carbon cycle*. Sci. Amer., **233**: 125—132.
BOLIN, B., ARRHENIUS, E., 1977, *Nitrogen — an essential life factor and a growing environmental hazard*. Ambio, **6**: 96—105.
BOND, G., 1963, *The root nodules of non-leguminous angiosperms*. Symposion of the Society for General Microbiology. XIII „Symbiotic associations". Cambridge, Univ. Press, p. 72—91.
BOND, G., 1976, *The result of the IBP survey of root nodule formation in non-leguminous angiosperms*. În: *Symbiotic nitrogen fixation in plants* (Nutman, P. S., ed.), International Biological Programme, vol. 7, p. 443—474.
BOND, G., 1976, *Observation on the root nodules of Purshia tridentata*. Proc. R. Soc. Londra, B, **193**: 127—135.
BONFANTE-FASOLO, P., MARZACHI, C., TESTA, B., 1986, *Structural modifications of the fungal wall before and during VAM symbiosis*. În: *Recognition in microbe — plant symbiotic and pathogenic interactions* (Lugtenberg, B., ed.). Springer-Verlag, New York, p. 283—286.
BONVENTRE, P. E., 1970, *The nomenclature of microbial toxins : problems and recommendations*. În: *Microbial toxins*, vol. I. *Bacterial protein toxins* (Ajl., S.J., Kadis, S. Montie, T. C., eds.). Acad. Press, New York, p. 29—66.
BOOTH, G. H., 1971, *Microbiological corrosion*. Mills and Boon Limited, Londra.
BOTNARIUC, N., 1967, *Principii de biologie generală*. Edit. Academiei, București.
BOTNARIUC, N., MURGOCI, A., PAPADOPOL, M., 1972, *Ecosistemele acvatice și productivitatea lor. Realizări și perspective în biologie*, p. 61—75.
BOTNARIUC, N., 1976, *Concepția și metoda sistemică în biologia generală*. Edit. Academiei, București.
BOTNARIUC, N., 1979, *Biologie generală*. Edit. Didactică și Pedagogică, București.
BOTNARIUC, N., VĂDINEANU, A., 1982, *Ecologie*. Edit. Didactică și Pedagogică, București.
BOTT, T. L., BROCK, T. D., 1970, *Growth and metabolism of periphytic bacteria : methodology*. Limnology and Oceanography, **15**: 333—342.
BOWEN, G. D., ROVIRA, A. D., 1976, *Microbial colonization of plant roots*. Ann. Rev. Phytopathol., **14**: 121—144.

BOWEN, G. D., 1980, *Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology*. În *Contemporary Microbial Ecology* (Ellwood, D. C., Hedger, J. N., Lathan, M. J., Lynch, J. M. eds.). Acad. Press, Londra, p. 283—304.

BRADE, H., BRADE, L., RIETSCHEL, E. TH., 1988, *Structure — activity relationships of bacterial lipopolysaccharides (Endotoxins). Current and future aspects*. Zbl. Bakt. Hyg. A., **268**: 151—179.

BRADLEY, S. G., 1981, *Direct action of bacterial endotoxin on cells, mitochondria and lysosomes*. În: *Pathophysiological effects of endotoxins at cellular level*. Alan R., Liss Inc., New York, 3—14.

BREWIN, N. J., WOOD, E. A., YOUNG, J.P.W., 1983, *Contribution of the symbiotic plasmid to the competitiveness of Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol., **129**: 2 973 — — 2 977.

BREZNAK, J. A., 1975, *Symbiotic relationships between termites and their intestinal microbiota*. Symposia of the Society for Experimental Biology. Symbiosis. Cambridge, Univ. Press, p. 559—580.

BRIDGES, B. A., 1976, *Survival of bacteria following exposure to ultraviolet and ionizing radiations*. Symposia of the Society for General Microbiology. XXVI. „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, Cambridge, p. 183—208.

BRILL, W. J., 1975, *Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation*. Ann. Rev. Microbiol., **29**: 109—129.

BRIAN, P. W., 1957, *The ecological significance of antibiotic production*. Symposia of the Society for General Microbiology ecology. VII „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 168—187.

BRIERLEY, C. L., 1978, *Bacterial leaching*. CRC Critical Rev. Microbiol., **6**: 207—262.

BRIERLEY, C. L., 1982, *Microbiological mining*. Sci. Amer., **247**: 42—53.

BRIERLEY, J. A., 1990, *Biotechnology for the extractive metals industries*. J. Minerals, Metals, Materials Society, **42**: 28—30.

BRIERLEY, J. A., 1990, *Acidophilic thermophilic archaebacteria: potential application for metal recovery*. FEMS, Microbiol. Rev., **75**: 287—292.

BRISBANE, P. G., LADD, J. N., 1965, *The role of microorganisms in petroleum exploration*. Ann. Rev. Microbiol., **19**: 351—364.

BROCK, T. D., BROCK, M. L., 1966, *Autoradiography as a tool in microbial ecology*. Nature (Londra), **209**: 734—736.

BROCK, T. D., 1966, *Principles of microbial ecology*. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

BROCK, T. D., 1967, *Life at high temperatures*. Science (S.U.A), **158**: 1 012—1 019.

BROCK, T. D., 1971, *Microbial growth rate in nature*. Bacteriol. Rev., **35**: 39—58.

BROCK, T. D., 1974, *Biology of microorganisms*. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

BROCK, T. D., 1980, *Microbial transformations of elements in aquatic systems*. În: *Microbiology* — 1980 (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington DC, p. 341—343.

BROOKS, M. A., 1964, *Symbiotes and their nutrition of medically important insects*. Bull. Wld. Hlth. Org., **31**: 555—559.

BROUGHTON, W. J., 1978, *Control specificity in legume — Rhizobium associations*. J. Appl. Bacteriol., **45**: 165—194.

BRUBAKER, R. R., 1985, *Mechanisms of bacterial virulence*. Ann. Rev. Microbiol., **39**: 21—50.

BROWN, M. E., 1972, *Plant growth substances produced by microorganisms of soil rhizosphere*. J. Appl. Bacteriol., **35**: 443—451.

BROWN, M. E., 1973, *Soil bacteriostasis. Limitation in growth of soil and rhizosphere bacteria*. Canad. J. Microbiol., **19**: 195—199.

BROWN, M. E., 1974, *Seed and root bacterization*. Ann. Rev. Phytopatol., **12**: 181—197.

BROWN, M. E., 1975, *Rhizosphere microorganisms — Opportunists, bandits and benefactors*. În: *Soil microbiology* (Walker N., ed.). Butterworths, Londra, p. 21—38.

BROWN, M. R. W., WILLIAMS, P., 1985, *The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections*. Ann. Rev. Microbiol., **39**: 527—556.

BRUBAKER, R. R., 1985, *Mechanisms of bacterial virulence*. Ann. Rev. Microbiol., **39**: 21—50.

BRUCH, C. W., 1967, *Microbes in the upper atmosphere and beyond*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monhitu J. L. eds.). Univ. Press, Cambridge, p. 345—374.

BRYANT, M. P., WOLIN, E. A. WOLIN, M. J., WOLFE, R. S., 1967, *Methanobacillus omelianski, a symbiotic association of two species of bacteria*. Archiv für Mikrobiologie, **59**: 20—31.

BUMPUS, J. A., MING TIEN, WRIGHT, D., AUST., S. D., 1985, *Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus.* Science (S.U.A), **228**: 1 434—1 436.

BUNT, J., 1971, *Microbial productivity in polar regions.* Symposia of the Society for General Microbiology. XXI „Microbes and biological productivity". Cambridge, Univ. Press, p. 333—354.

BURG, E., GUILLAUME, J., TAILLIEZ, R., 1982, *Chemotaxis by Rhizobium meliloti.* Arch. Microbiol., **133**: 162—169.

BURGES, A., 1963, *Some problems in soil microbiology.* Trans. Brit. Mycol. Soc., **46**: 1—14.

BURNHAM, J. C., HASHIMOTO, T., CONTI, S. F., 1968, *Electron microscopic observations on the penetration of Bdellovibrio bacteriovorus into Gram-negative bacterial hosts.* J. Bacteriol., **96**: 1 366 — 1 381.

BURNS, R. G., 1977, *Soil enzymology.* Sci. Progr., Oxford, **64**: 275—285.

BURNS, R. G., 1983, *Extracellular enzyme substrate interactions in soil.* Society Symposium of the Society for General Microbiology, XXXIV „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 249—298.

BURNS, R. G., MARTIN, J. P., 1986, *Biodegradation of organic residues in soil.* În: *Developments in biogeochemistry Microfloral and faunal interactions in natural and agroecosystems* (Mitchell, M. J., Nakas, J. P., eds.), M. Nijhoff Publ., p. 137—201.

BURRIS, R. H., 1977, *Overview of nitrogen fixation,* În: *Genetics engineering for nitrogen fixation* (Hollaender, A., ed.). Plenum Press, New York, p. 9—81.

BUSWELL, J. A., ODIER, E., 1987, *Lignin biodegradation.* În: *Critical Review Biotechnology* (Stewart, G. G., Russell, I., eds.), Boca Raton, S.U.A., p. 1—60.

BUTLER, N. J., 1968, *The microbiological deterioration of cosmetics and pharmaceutical products.* Proc. 1st Int. Biodeter. Symp., Elsevier, Publ. Co. Ltd., Essex, Anglia, p. 269—280.

BUXTON, E. W., 1964, *Speculations on plant pathogen — host relations.* Symposia of the Society for General Microbiology. XIV „Microbial behaviour *„in vivo"* and *„in vitro"*. Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 145—164.

CALABRESE, D. M., NICKERSON, K. W., LANE, L. C., 1980, *A comparison of protein crystal subunit sizes in Bacillus thuringiensis.* Canad. J. Microbiol., **26**: 1 006—1 010.

CAMPBELL, L. L., PACE, B., 1968, *Physiology of growth at hight temperatures.* J. Appl. Bacteriol., **31**: 24—35.

CAMPBELL, R., 1977, *Microbial ecology* vol. V, *Basic Microbiology* Wilkinson J. F., ed.). Blackwell Sci. Publ., Oxford.

CARTWRIGHT, N. J., HOLDON, K. S., 1973, *Enzymic lignin, its release and utilization by bacteria.* Microbios, **8**: 7—14.

CASIDA, L. E., 1982, *Ensifer adhaerens gen nov. sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil.* Intern. J. Syst. Bacteriol., **32**: 339—345.

CAVALIER-SMITH, T., 1987, *Eukaryotes with no mitochondria.* Nature (Londra), **326**: 332—333.

CAVANAUGH, C. M., GARDINER, S., JONES, M. L., JANNASCH, H. W., WATERBURY, J. B., 1981, *Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tubeworm Riftia pachyptila Jones. Possible chemoautotrophic symbionts.* Science (S.U.A), **213**: 340—342.

CHAKRAVORTY, A. K., SHAW, M., 1977, *A possible molecular basis for obligate host — pathogen interactions.* Biol. Rev., **52**: 147—179.

CHAMBERLAIN, A. C., 1967, *Deposition of particles to natural surfaces.* 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.), Cambridge Univ. Press, p. 138—164.

CHEDID, L., 1976, *Biological activities of detoxified bacterial lipopolysaccharides.* Bull. Inst. Pasteur, **74**: 103—105.

CHET, I., MITCHELL, L. R., 1976, *Ecological aspects of microbial chemotactic behaviour.* Ann. Rev. Microbiol., **30**: 221—239.

CLARKE, P. H., 1980, *Microbiology and pollution : the biodegradation of natural and synthetic organic compounds.* Phil. Trans. R. Soc., London, B, **290**: 355—367.

CLARK, F. E., 1966, *Ecological associations among soil microorganisms.* Paper. no. 1 040. Scientific series of soil and water Conservation Research Division United States Department of Agriculture, p. 125—161.

CLAUS, D., WALKER, N., 1964, *The decomposition of toluene by bacteria.* J. Gen. Microbiol., **36**: 107—122.

CLOUD, P., GIBOR, A., 1970, *The oxygen cycle.* Sci. Amer., **223**: 111—120.

COLEMAN, G. S., 1963, *The growth and metabolism of rumen ciliate protozoa.* Symposia of the Society for General Microbiology. XIII „Symbiotic associations", Cambridge, Univ. Press, p. 298—324.

COLEMAN, D. C., 1985, *Through a ped darkly : an ecological assessment of root — soil — microbial — faunal interactions.* În : *Ecological interactions in soil : plants, microbes and animals,* British Ecological Society. Soil ecology (Fitter, A., Atkinson, D., Read, D., Usher, M.B., eds.), p. 1—22.

COLLIER, R. J., 1975, *Diphteria toxin : mode of action and structure.* Bacteriol. Rev., **39**: 54—85.

COLWELL, R., R., 1980, *Human pathogenes in the aquatic environment.* În : *Microbiology* — 1980 (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. for Microbiol., Washington D. C., p. 377—379.

COSTELLO, J. A., *The corrosion of metals by microorganisms : a literature survey.* Int. Biodetn. Bull., **5**: 101—118.

COSTERTON, J. W., IRWIN, R. T., CHENG, K. J., 1981, *The role of bacterial surface structures in pathogenesis.* C.R.C. Critical Rev. Microbiol., p. 303—338.

COSTERTON, J. W., IRWIN, R. T., 1981, *The bacterial glycocalyx in nature and disease.* Ann. Rev. Microbiol., **35**: 299—324.

COUGHTER, J. P., STEWART, G. J., 1989, *Genetic exchange in the environment.* Antonie van Leeuwenhoek, **55**: 15—22.

COX, F. E. G., 1975, *Factors affecting infections of mammals with intraerythrocytic protozoa.* În : Symposia of the Society Experimental Biology, XXIX, „Symbiosis", Cambridge, Univ. Press, p. 429—451.

COWEN, J. P., WILCOX SILVER, M., 1984, *The association of iron and manganese with bacteria on marine macroparticulate material.* Science (S.U.A), **224**: 1 340 — 1 342.

CRAIG, J.P., 1972, *The enterotoxic enteropathies.* Symposia of the Society for General Microbiology, XXII „Microbial pathogenicity in man and animals". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 129—155.

CRAWFORD, D., CRAWFORD, R. L., 1980, *Microbial degradation of lignin.* Enzyme Microb. Technol., **2**: 11—22.

CRAWFORD, R. L., CRAWFORD, R. L., 1984, *Recent advances in studies of the mechanisms of microbial degradation of lignins.* Enzyme Microb. Technol., **6**: 434—442.

CRIPPS, R. E., 1971, *The microbial breakdown of pesticides.* În : *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 255—266.

CROWDY, S. H., MANNERS, J. G., 1971, *Microbial disease and plant productivity.* Symposia of the Society for General Microbiology. XXI „ Microbes and biological productivity". Oxford, Univ. Press, Londra, p. 103—123.

CULLEN, J. M., HASAN, S., 1988, *Pathogens for the control of weeds.* Phil. Trans. R. Soc. London, B, **318**: 213—224.

CUMMINGS, J. H., 1983, *Fermentation in human large intestine: evidence and implications for health.* Lancet, **2**: 1 206 — 1 208.

DAGLEY, S., 1975, *Microbial degradation of organic compounds in the biosphere.* Amer. Sci., **63**: 681—689.

DALTON, H., MORTENSON, L. E., 1972, *Dinitrogen ($N_2$) Fixation (with a biochemical emphasis).* Bacteriol. Rev., **36**: 231 — 260.

DARBYSHIRE, J. F., 1975, *Soil Protozoa — Animalcules of the subterranean microenvironment.* În : *Soil Microbiology* (Walker, N. ed.). Butterworths and Co, Londra, p. 147—163.

DARLOW, H. M., 1971, *Disposal of infective laboratory material.* În : *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 281—289.

DART, P. J., DAY, J. M. 1975, *Non-symbiotic nitrogen fixation in soil.* În : *Soil microbiology* (Walker, MN., ed.). Butterworths, Londra, p. 225 — 252.

DASTE, P., 1956, *La décomposition de la chitine par les microorganismes.* Ann. Biol., 32 : 473—488.

DAVEY, C. B., DANIELSON, R. M., 1968, *Soil chemical factors and biological activity.* Phypathol., **58**, 900 — 908.

DAVID, W. A., L., 1975, *The status of viruses pathogenic for insects and mites.* Ann. Rev. Entomol., **20**: 97 — 117.

DAVIES, J., 1990, *What are antibiotics? Archaic functions for modern activities.* Molec. Microbiol., **4**: 1 227 — 1 232.

DAVIS, J. B., UPDEGRAFF, D. M., 1954, *Microbiology in the petroleum industry.* Bacteriol. Rev., **18**: 215 — 238.

DAVIS, J. B., RAYMOND, R. L., STANLEY, J. P., 1959, *Areal constrasts in the abundance of hydrocarbon oxidizing microbes in soils.* Appl. Microbiol., **7**: 156 — 165.

DAVIS, J. B., 1966, *Microbial intra- and extracellular products of hydrocarbons oxidation.* În : Vorträge des internationalen Symposiums *Erdölmikrobiologie* (Malek I., Schwartz EW. eds.). Akad. Verlag, Berlin, p. 129 — 142.

DAVIS, J. B., 1967, *Petroleum microbiology.* Elsevier Publ. Co. New York.

DAVIS, J. G., 1971, *Microbial aspects of pollution : some general considerations.* În : *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 1—10.
DAWES, E. A., 1976, *Endogeneous metabolism and the survival of starved prokaryotes.* Symposia of the Society for General Microbiology. XXVI „The survival of vegetative microbes", Cambridge, Univ. Press, Cambridge, p. 19 — 53.
DAWS, L. F., 1967, *Movement of air streams indoors.* 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.). Univ. Press Cambridge, p. 31—56.
DAY, P. R., 1984, *Genetics of recognition systems in host-parasite interactions.* În : *Cellular interactions* (Linskens, H. F., Harrison-Heslop., J., eds.). Springer-Verlag, New York, p. 134—147.
DAZZO, F. B., 1981, *Bacterial attachment as related to cellular recognition in the Rhizobium — legume symbiosis.* J. Supramolec. Structure and cellular Biochem., **16**: 29 — 41.
DELWICHE, C. C., 1970, *The nitrogen cycle.* Sci. Amer., **233**: 136 — 146.
DELWICHE, C. C., BRYAN, B. A., 1976, *Denitrification.* Ann. Rev. Microbiol., **30**: 241—262.
DELWICHE, C. C., 1980, *Volatile biological elements through time.* În : *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington DC p. 344—347.
DERBYSHIRE, J. B., 1972, *Microbial diseases and animal productivity, 1972.* Symposia of the Society for General Microbiology. XXI „Microbes and biological productivity", Univ. Press, Londra, Cambridge, p. 125—147.
DESBRUYÈRES, D., GAILL, F., LAUBIER, L., PRIEUR, D., RAU, G. H., 1983, *Unusual nutrition of the „Pompeii worm". Alvinella pompejana (polychetous annelid) from a hydrothermal vent environment : SEM, TEM, $^{13}C$ and $^{15}N$ evidence.* Marine biology, **75**: 201—205.
DESBRUYÈRES, D., LAUBIER, L., 1984, *Primary consumers from hydrothermal vents animal communities.* În : *Hidrothermal processes at seafloor spreading centers* (Rona, P. A., Bostrom, K., Laubier, L., Smith, K. L. jr., eds.). Plenum Press Co.
DEVÈZE, L., 1964, *Activités bacterieunes et matières organique dans les sediments marins.* Ann. Inst. Pasteur, Paris, **107**: 123 — 135.
DILWORTH, M. J., PARKER, C. A., 1969, *Development of the nitrogen-fixing system in legumes.* J. Theoret. Biol., **25**: 208 — 218.
DIXON, R. O. D., 1969, *Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants).* Ann. Rev. Microbiol., **23**: 137—158.
DIXON, R. A., 1986, *The phytoalexin response; elicitation, signalling and control of host gene expression.* Biol. Rev., **61**: 239—291.
DIXON, R. A., LAMB, C. J., 1990, *Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogenes.* Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol., **41**: 339—367.
DJORDJEVIC, M. A., ZURKOWSKI, W., SHINE, J. ROLFE, B. G., 1983, *Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of Rhizobium trifolii, R. leguminosarum and R. meliloti.* J. Bacteriol., **156**: 1 035 — 1 045.
DOBEREINER, J., 1977, *Biological nitrogen fixation in tropical grasses. Possibilities for partial replacement of mineral N fertilizers.* Ambio., **6**: 174—177.
DOEMEL, W. N., BROCK, T. D., 1974, *Bacterial stromatolitis : origin of laminations.* Science (S.U.A.), **184**: 1 083 — 1 085.
DOSCHER, T. M., 1981, *Enhanced recovery of crude oil.* Amer. Sci., **69**: 193—199.
DOUGLAS, C. J., STANELONI, R. J., RUBIN, R. A., NESTER, E. W., 1985, *Identification and genetic analysis of an Agrobacterium tumefaciens chromosomal virulence region.* J. Bacteriol., **161**: 850 — 860.
DOW, C. S., WHITTENBURY, R., CARR, N. G., 1983, *The „shut down" or „growth precursor" cell-an adaptation for survival in a potentially hostile environment.* Symposia of the Society for General Microbiology. XXXIV „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 187—248.
DOWLING, D. N., BROUGHTON, W. J., 1986, *Competition for nodulation of legumes.* Ann. Rev. Microbiol., **40**: 131 — 157.
DOWNING, A. L., 1971, *The scope of the water pollution problem.* În : *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 51—70.
DOYLE, R. J., SONNENFELD, E. M., 1989, *Properties of the cell surfaces of pathogenic bacteria.* Internat. Rev. Cytol., **118**: 33 — 92.
DOYLE, R. J., SLIFKIN, M. 1989', *Applications of lectins in Microbiology*, **55**: 655 — 659.
DROOP, M. R., 1963, *Algae and invertebrates in symbiosis.* Symposia of the Society for General Microbiology. XIII „Symbiotic associations". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 171—199.

DROUHET, E., 1972, *Champignons opportunistes et mycoses iatrogènes*. Bull. Inst. Pasteur, **70**: 391 — 464.
DRUETT, H. A., 1967, *The inhalation and retention of particles in the human respiratory system*. 17 Syposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory P. H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge Univ. Press, p. 165—1202.
DUBOS, R., KESSLER, A., 1963, *Integrative and disintegrative factors in symbiotic associations*. Symposia of the Society for General Microbiology. XIII „Symbiotic associations". Oxford, Univ. Press, Londra, p. 1—11.
DUDDINGTON, C. L., 1957, *The predacions fungi and their place in microbial ecology*. Symposium of the Society for General Microbiology. VII „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 218—237.
DURAND, G., 1965, *Les enzymes dans le sol*. Rev. Ecol. Biol. Sol., **2**: 141—1205.
DURNER, G., RÖMER, R., SCHWARTZ, W., 1965, *Untersuchungen über die lebensgemeinschaften des sulphuretums*. Zeitschr. für Allg. Mikrobiol., **5**: 206 — 221.
DYER, B. D., 1989, *Symbiosis and organismal bondaries*. Amer. Zool., **28**: 1 085 — 1 093.
EDMOND, J. M., VON DAMM, K., 1983, *Hot springs on the ocean floor*. Sci. Amer., **248**: 78 — — 93.
EGGINS, H.O.W., 1968, *Ecological aspects of biodeterioration*. În: *Biodeterioration of materials. Microbiological and allied aspects* (Walters, A. H., Elphick, J. J., eds.). Elsevier Publ. Co, Londra, p. 22 — 27.
EGGINS, H. O. W., MILLS, J., HOLT, A., SCOTT, G., 1971, *Biodeterioration and biodegradation of synthetic polymers*. În: *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 267—280.
EGGINS, H. O. W., ALLSOPP, D., 1975, *Biodetericration and biodegradation by fungi*. În: *The filamentous fungi*, vol. I, *Industrial Mycology* (Smith, J. E., Berry D. R., eds.). Edw. Arnold Ltd., Londra.
EHRLICH, H. L., 1985, *The position of bacteria and their products in food webs*. În: *Bacteria in nature* (Leadbetter, E. R., Poindexter, J. S., eds.). Plenum Press, New York, p. 199 — 219.
EIDELS, L. R., PROIA, R. L., HART, D. A., 1983, *Membrane receptors for bacterial toxins*. Microbiol. Rev., **47**: 596—620.
ELIADE, G., GHINEA, L., ȘTEFANIC, G., 1975, *Microbiologia solului*. Edit. Ceres, București.
ELIADE, G., CHINEA, L., ȘTEFANIC, G. 1983, *Bazele biologice ale fertilității solului*. Edit. Ceres, București.
ELLFOLK, N., 1972, *Leghaemoglobin, a plant haemoglobin*. Endeavour, **XXXI**: 139—142.
ELLWOOD, D. C., KEEVIL, C. W., MARSH, P. D., BROWN, C. M., WARDELL, J. N., 1982, *Surface — associated growth*. Phil. Trans., R. Soc., London, B, **297**: 517—532.
ELMERICH, C., BOZOUKLIAN, H., VIEILLE, C., FOGHER, C., PERROUD, B., PERRIN, A., VANDERLEYDEN, J., 1987, *Azospirillum: genctics of nitrogen fixation and interaction with plants*. Phil. Trans. R. Soc., London, B, **317**: 183—192.
ELSDEM, S. R., 1966, *The contribution of the ruminant to Microbiology*. Path. Microbiol., **29**: 601—615.
ELWELL, L. P., SHIPLEY, P. L., 1980, *Plasmid — mediated factors associated with virulence of bacteria to animals*. Ann. Rev. Microbiol., **34**: 465—496.
EREN, J., PRAMER, D., 1978, *Growth and activity of the nematode — trapping fungus Arthrobotrys conoides in soil*. În: *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J.A.R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 121—127.
EVANS, D. M., 1968, *The deterioration of bookbinding materials*, Monograph No. 23, Soc. Chemical Ind. Leatherhead, Anglia, p. 179—184.
EVANS, H. J., BARBER, L. E., 1977, *Biological nitrogen fixation for food and fiber production*. Science (S.U.A), **197**: 332—340.
EVANS, H. J., ZUBER, M., DALTON, D. A., 1987, *Some processes related to nitrogen fixation in nodulated legumes*. Phil. Trans. R. Soc. London B, **317**: 209—225.
EVANS, W. C., 1968, *The microbiological degradation of aromatic compounds*. J. Gen. Microbiol., **32**: 177 — 184.
FAN, L. T., GHARPURAY, M. M., LEE, Y. — M., 1987, *Cellulose hydrolysis*. Springer-Verlag, New York.
FEHRENBACH, F. J., 1974, *Pathogenitätsfaktoren Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien*. Zbl. Bakt. Hyg., I, Abt. Orig. A, **227**: 146 — 149.
FENCHEL, T., 1987, *Ecology — potentials and limitation*. Ecology Institute Oldendorf Germania
FINEGOLD, S. M., SUTTER, V. L., MATHISEN, G. E., 1983, *Normal indigenous intestinal flora*. În: *Human intestinal microflora in health and disease* (Hentges, D. J., ed.). Academic Press, New York, p. 3—32.

FINLAY, B. B., FALKOW, S., 1989, *Common themes in microbial pathogenivity*. Microbiol. Rev., **53**: 210—230.

FISCHER, E., 1970, *Production of chemosynthetizing bacteria as a chain of energy recuperation by aquatic biocenosis*. Polskie Archiw. Hydrobiol., **17**: 109 — 1 015.

FJERDINGSTAD, E., 1971, *Microbial criteria of environment qualities*. Ann. Rev. Microbiol., **25**: 563 — 582.

FLAIG, W., 1964, *Effects of microorganisms in the transformation of lignin to humic substances*. Geochim. Cosmochim. Acta, **28**: 1 523 — 1 535.

FLOODGATE, G. M., 1980, *Methods of assessment of microbial biomass and activity in aquatic environments*. În: *Microbiology* — 1980 (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 355—360.

FOLEY, R. T., 1967, *Introductory remarks concerning the importance of the investigation of microbiological corrosion*. Electrochem. Technol., **5**: 71 — 74.

FOSTER, R. C., ROVIRA, A. D., 1978, *The rhizosphere. The ultrastructure of the rhizosphere of Trifolium subterraneum L.* În: *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 278 — 290.

FRANKEL, R. B., BLAKEMORE, R. P., 1989, *Magnetite and magnetotaxis*. Bioelectromagn., **10**: 223—237.

FRANKS, F., MATHIAS, S. F., HATLEY, R. M. H., 1990, *Water temperature and life*. Phil. Trans. Roy. Soc. London, B, Biol. Sci., **326**: 517—535.

FREDRICKSON, A. G., STEPHANOPOULOS, G., 1981, *Microbial competition*. Science, S.U.A. **213**: 972 — 979.

FRIEDMAN, S. M., 1968, *Protein — synthesizing machinery of thermophilic bacteria*. Bacteriol. Rev. **32**: 27—38.

FUHRMAN, J. A., McMANUS, G. B., 1984, *Do bacteria — sized marine eukaryotes consume significat bacterial production* Science (S.U.A), **224**: 1 257 — 1 259.

FULLER, R., 1978, *Epithelial attachment and other factors controlling the colonization of the intestine of the gnotobiotic chick by lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol., **46**: 335—342.

FULLER, R., 1989, *Probiotics in man and animals*. J. Appl. Bacteriol., **66**: 365 — 378.

GAINEY, P. L., LORD, T. H., 1952, *Microbiology of water and sewage*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey,

GALUN, M., BUBRICK, P., 1984. *Physiological interactions between the partners of the lichen symbiosis*. În: *Cellular interactions* (Linskens, H. E., Harrison-Heslop, J., eds.). Springer-Verlag, New York, p. 362 — 401.

GARROD, D., ASHWORTH, J. M., 1973, *Development of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum*. În: XXIII Symposia of the Society for General Microbiology „Microbial differentiation" Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 407—435.

GAUDY, A. F. jr., GAUDY, E. T., 1966, *Microbiology of waste waters* Ann. Rev. Microbiol., **20**: 319—336.

GEESEY, G. G., WHITE, D. C., 1990, *Determination of bacterial growth and activity at solid — lichid interfaces*. Ann. Rev. Microbiol., **44**: 579—602.

GENOVESE, S., RIGANO, C., 1964, *Sull impiego delle misure del potenziale redox nelle ricerche ecologische*. Boll. Pesca, Piscicultura e Idrobiologia, **XVIII**: 57—70.

GEST, H., MANDELSTAM, J., 1987, *Longevity of microorganisms in natural environments*. Microbiol. Sciences, **4**: 69—71.

GHIORSE, W. C., 1984, *Biology of iron- and manganese- depositing bacteria*. Ann. Rev. Microbiol., **38**: 515—550.

GHIORSE, W. C., WILSON, J. T., 1989, *Microbiol ecology of the terrestrial subsurface*. Adv. Appl. Microbiol., **33**: 107 — 172.

GHOSAL, D., YOU, S., CHATTERJEE, D. K., CHAKRABARTY, A. M., 1985, *Microbial degradation of halogenated compounds*. Science (S.U.A), **228**: 135 — 142.

GIBSON, J., 1957, *Nutritional aspects of microbial ecology*. Symposium of the Society for General Microbiology. VII „Microbial ecology", Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 22—41.

GILL, D. M., PAPPENHEIMER, Jr. A. M., UCHIDA, T., 1973, *Diphteria toxin, protein synthesis and the cell*. Fed. Proceed. **32**: 1 508 — 1 515.

GILL, D. M., 1976, *Protein toxins that act within cells*. Bull. Inst. Pasteur, **74**: 65—84.

GILL, D. M., 1982, *Bacterial toxins : a table of lethal amounts*. Microbiol. Rev., **46**: 86 — 94.

GINSBURG, I., 1980, *The biochemistry of bacteriolysis : paradoxes, facts and miths*. Microbiol. Sci., **5**: 137 — 142.

GOLDSTEIN, J. L., ANDERSON, R. G. W., BROWN, M. S., 1979, *Coated pits, coated vesicles, and receptor — mediated endocytosis*. Nature (Londra), **279**: 679 — 685.

GOODAY, G. W., DOONAN, S. A., 1980, *The ecology of algal—invertebrate symbioses.* În: *Contemporary Microbial Ecology* (Elwood, D. C., Hedger, J. N., Latham, M. J., Lynch, J. M., Slater, J. H., eds.). Acad, Press, Londra, p. 377—390.

GOODNOW, R. A., HARRISON, A. P. JR., 1972, *Bacterial degradation of detergent compounds.* Appl. Microbiol., **24**: 555—560.

GORDON, H. A., PESTI, L., 1971, *The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationship.* Bacteriol. Rev., **35**: 390 — 429.

GORLENKO, V. M., DUBININA, G. A., KUZNETSOV, S. I., 1983, *The ecology of aquatic microorganisms* (Ohle, W., ed). Schweizerbart'sche Verlagsbuchhanlung, Stuttgart.

GOTTSCHAL, J. C., 1985, *Some reflections on microbial competitiveness among heterotrophic bacteria*, Ant. van Leeuwenhoek, **51**: 473—494.

GRANT, W. D., MWATHA, W. E., JONES, B. E., 1990, *Alkaliphiles : ecology, diversity and applications.* FEMS, Microbiol. Rev., **75**: 255 — 270.

GRASLE, J. F., 1985, *Hydrothermal vent animals : distribution and biology.* Science (S.U.A.), **229**: 713 — 717.

GRAY, T. R. G., BANBY, P., 1968, *Chitin decomposition in soil. II. The ecology of chitinoclastic microorganisms in forest soils.* Trans. Br. Mycol. Soc., **51**: 293 — 309.

GRAY, T.R.G., WILLIAMS, S. T., 1971, *Microbial productivity in soil.* Symposia of the Society for General Microbiology. XXI ,,Microbes and biological productivity'', Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 255—286.

GRAY, T.R.G., 1976, *Survival of vegetative microbes in soil.* Symposia of the Society for General Microbiology. XXVI, ,,The survival of vegetative microbes'', Cambridge, Univ. Press, Cambridge, p. 327—364.

GREAVES, H., LEVY, J. F., 1968, *Microbial associations in the deterioration of wood under long-term exposure.* Monograph No 23, Soc. Chem. Ind. Leatherhead, Anglia, p. 429—443.

GREENSLATE, G., 1974, *Microorganisms participate in the construction of manganese nodules.* Nature (Londra), **249**: 181—183.

GRIFFITHS, E., 1965, *Microorganisms and soil structure.* Biological Rev., **40**: 129 — 142.

GROMOV, B. V., MAMKAEVA, K.A., 1972, *Electron microscope examination of Bdellovibrio chlorellavorus parasitism on cells of green alga Chlorella vulgaris.* Citologhia, **14**: 256—260.

GUERINOT, M. L., CHELM, B. K., 1987, *Molecular aspects of the physiology of symbiotic nitrogen fixation in legumes.* În: *Plant — microbe interactions. Molecular and genetic perspectives* (Kosuge, T., Nester, E. W., eds.), vol. 2, Macmillan Publ. Co, New York, p. 103—146.

GUERRERO, R., PEDRÓS-ALIÓ C., ESTEVE, I., MAS, J., CHASE, D., MARGULIS, L., 1986, *Predatory prokaryotes : Predation and primary consumption envolved in bacteria.* Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A. , **83**: 2 138 — 2 142.

GUERRERO, R., ESTEVE, I., PEDRÓS-ALIÓ, C., GAJU, N., 1987, *Predatory bacteria in prokaryotic communities. The earliest trophic relationship.* Annals New York, Acad. Sci. **503**: 238—250.

GUTNICK, D. L., ROSENBERG, E., 1977, *Oil tankers and pollution : a microbiological approach.* Ann Rev. Microbiol., **31**: 379 — 396.

HACSKAYLO, E., 1972, *Mycorrhiza: The ultimate in reciprocal parasitism.* BioScience, **22**: 577 — 583.

HAIDER, M. Z., ELLAR, D. J., 1987, *Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of Bacillus thuringiensis crystal-endotoxin.* Biochem, J., **248**: 197—201.

HANERT, H., 1968, *Untersuchungen zur isolierung, Stoffwechsel physiologie und morphologie von Gallionella ferruginea.* Ehrenberg. Archiv fur Mikrobiol., **60**: 348—376.

HARDER, W., DIJKHUIZEN, L., 1982, *Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms.* Phil. Trans. R. Soc. London, B, **297**: 459—480.

HARDY, R. W. F., HAVELKA, U. D., 1975, *Nitrogen fixation research. A key to world food.* Science (S.U.A)., **188**: 633—643.

HARLEY, J. L., 1971, *Associations of microbes and roots.* Symposia of the Society for General Microbiology. 21 ,,Microbes and biological productivity'', Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 309—332.

HARLEY, J. L., 1984, *The mycorrhizal associations.* În: *Cellular interactions* (Linskens, H. F., Harrison-Heslop, J., eds.). Springer-Verlag, New York, p. 148—186.

HARMSEN, L., NISSENT, V., 1965, *Der Bakterienangriff auf Holz. Holz als Roh und Werkstoff*, **23**: 389—393.

HARMSEN, L., NISSEN, T. V., 1965, *Timber decay caused by bacteria*, Nature (Londra), **206**: 319—320.

HARDER, S. R., POHLAND, F. G., 1986, *Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment.* Biotechnology, and Bioengineering, **28**: 585 — 602.

HARRIS, R. H., MITCHELL, R., 1973, *The role of polymers in microbial aggregation.* Ann. Rev. Microbiol., X: 27 — 50.

HARRISON, JR. A. P., 1984 *The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat.* Ann. Rev. Microbiol., **38**: 265 — 292.

HARVEY, P. J., SCHOEMAKER, H. E., PALMER, J. M., 1987, *Mechanisms of ligninase catalysis.* În: *Lignin enzymic and microbial degradation* (Odier, E., ed.). Inra, Paris p. 145—150.

HAWKER, L. E., 1957, *Ecological factors and the survival of fungi.* Symposium of the Society for General Microbiology. 7 „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 238—257.

HAWKES, H. A., 1971, *Disposal by dilution. An ecologist's viewpoint.* În: *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 149—179.

HAWKSWORTH, D. L., 1992, *Biodiversity in microorganisms and its role in ecosystem function.* În: *Biodiversity and global change* (Solbrig, O.T., van Emden, H. M., van Oordt, P.G.W.J., eds.). IUBB, Paris, p. 83—93.

HAYMAN, D. S., MOSSE, B., 1971, *Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhyza. I. Growth of Endogone-inoculated plants in phosphate-deficient soils.* New Phytol., **70**: 19 — 27.

HAYMAN, D. S., MOSSE, B., 1972, *Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increased uptake of labile P from soil.* New Phytol., **71**: 41—47.

HAYMAN, D. S., 1975, *Phosphorus cycling by soil microorganisms and plant roots.* În: *Soil microbiology* (Walker, N., ed.). Butterworths, Londra, p. 67—91.

HAYMAN, D. S., 1980, *Mycorrhiza and crop production.* Nature (Londra), **287**: 487—490.

HEIMPEL, A. M., ANGUS, T. A., 1960, *Bacterial insecticides.* Bacteriol. Rev., **24**: 266—268.

HEINEN, W., 1974, *Microbial interaction with non-physiological elements and the substitution of bioelements.* Biosistems, **6**: 133 — 151.

HENON, M., DELAUNAY, A., BAZIN, S., 1968, *Réactions métaboliques provoquées „in vivo" et „in vitro" par les endotoxines bactériennes.* Biol. méd., **57**: 471—519.

HEPPER, C. M., 1975, *Extracellular polysaccharides of soil bacteria.* În: *Soil microbiology* (Walker, N., ed.). Butterworths, Londra, p. 93—110.

HERRNSTADT, C., GILORY, T. E., SOBIESKI, D. A., BENNETT, B. D., GAERTNER, F. H., 1987, *Nucleotide sequence and deduced aminoacid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from Bacillus thuringiensis subsp. san diego,* Gene, **57**: 37—46.

HESPELL, R. B., 1987, *Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem.* Proceed. Nutrit. Soc., **46**: 407—413.

HESPELL, R. B., 1988, *Microbial digestion of hemicelluloses in the rumen.* Microbiol. Sci., **5**: 362— 365.

HEWITT, L. F., 1957, *Influence of hydrogen-ion concentration and oxidation — reduction conditions on bacterial behaviour.* Symposium of the Society for General Microbiology. 7 „Microbial ecology", Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 42 — 55.

HIGUCHI, T., 1971, *Formation and biological degradation of lignins.* În: *A vance Enzymology* (Nord, F. F., ed). J. Wiley and Sons Inc. New York, p. 207—283

HILL, D. S., 1965, *Recent studies on the microbial degradation of cotton.* Agric. and Food Chem., **13**: 418— 423.

HILL, E. C., DAVIES, I., PRITCH-ARD, J. A. V., BYRON, D., 1967, *The estimation of microorganisms in petroleum products.* J. Inst. Petrol., **53**: 275—279.

HIRST, J. M., HURSTH, G. W., 1967, *Long-distance spore transport.* 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.), Cambridge, Univ. Press., p. 307—344.

HITCH, C. J. B., STEWART, W. D. P., 1973, *Nitrogen fixation by lichens in Scotland.* New-Phytol., **72**: 509 — 524.

HOBSON, P. N., SHAW, B. G., 1971, *The role of strict anaerobes in the digestion of organic material.* În: *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds). Acad. Press, New York, p. 103—122.

HOFTE H., WHITELEY, H. R., 1989, *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis.* Microbiol. Rev., **53**: 242 — 255.

HOOGKAMP-KORSTANJE, J. E., LINDNER, J. G. E. M., MARCELIS, J. H., DEN DAAS -SLAGT, H., DE VOS, N. M., 1979, *Composition and ecology of human intestinal flora.* Antonie van Leeuwenhoek, **45**: 33 — 40.

HOOYKAAS, P. J. J., SCHILPEROORT, R. A., 1986, *The molecular basis of the Agrobacterium — plant interaction*. În: *Recognition in microbe — plant symbiotic and pathogenic interactions* (Lugtenberg, B., ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 189—202.

HORI, H., 1992, *Evolutionary outline of living organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences*. În: *Biodiversity and global change* (Solbrig, O. T., van Oordt, P. G. W. J., eds.). IUBB, Paris, p. 95—104.

HORNECK, G., BÜCKER, H., REITZ, G., REQUARDT, H., DOSE, K., MARTENS, K. D., MENNIGMANN, H. D., WEBER, P., 1984, *Microorganisms in the space environment*. Science (S.U.A.), **225**: 226 — 228.

HORVATH, R. S., 1972, *Microbial Co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature*. Bacteriol. Rev., **36**: 146 — 155.

HOTCHIN, J., LORENZ, P., HEMENWAY, C., 1965, *Survival of microorganisms in space*. Nature (Londra), **206**: 442 — 445.

HUGHES, R. L., 1968, *Microbiological deterioration in the paper printing and packaging industries*. În: *Biodeterioration of materials. Microbiological and allied Aspects* (Walters, A. H., Elphick, J. J., eds.). Elsevier Publ. Co, Londra, p. 281—290.

HUGO, W. B., 1976, *Survival of microbes exposed to chemical stress*. Symposia of the Society for General Microbiology. 26 „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, p. 383—413.

HUNGATE, R. E., 1978, *Gut microbiology*. În: *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 258—264.

HURST, A., 1977, *Bacterial injury : a review*. Canad. J. Microbiol., **23**: 609—620.

HUTCHINSON, G. E., 1970, *The Biosphere*. Sci., Amer., **223**: 45 — 53.

HUTCHINSON, G. E., 1973, *Eutrophication*. Amer, Sci. **61**: 269 — 279.

HUTCHINS, S. R., DAVIDSON, M. S., BRIERLEY, J. A., BRIERLEY, C. L., 1986, *Microorganisms in reclamation of metals*. Ann. Rev. Microbiol., **40**: 311 — 336.

HUTCHINS, S. R., BRIERLEY, J. A., BRIERLEY, C. L., 1988, *Microbial pretreatment of refractory sulfide and carbonaceous ores improves the economics of gold recovery*, Min. Eng. April, 249—254.

HYSLOP, N. ST. G., 1978, *Observations on the survival of pathogens in water and air at ambient temperatures and relative humidity*. În: *Microbial ecology* (Loutit M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 197—205.

IMHOF, G., BURIAN, K., 1972, *Energy-flow studies in a wetland ecosystem (Reed belt of the lake Neusiedler See)*. Special Publ. Austr. Acad. Sci. for IPP, Springer-Verlag, Viena.

INGOLD, C. T., 1967, *Liberation mechanisms of fungi*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge, Univ. Press, p. 102—115.

INGRAM, M., 1957, *Microorganisms resisting high concentrations of sugar or salts*. Symposium of the Society for General Microbiology. 7 „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 90—133.

INNIS, W. E., 1975, *Interaction of temperature and psychrophilic microorganisms*. Ann. Rev. Microbiol., **29**: 445—465.

JACKSON, R. M., 1975, *Soil fungi*. În: *Soil microbiology* (Walker, N., ed.). Butterworths, Londra, p. 165—180.

JACKSON, M., 1990, *Structure function analyses of Shiga toxin and the Shiga-like toxins*. Microbial Pathogen, **8**: 235—242.

JACOBSON, M., BEROZA, M., 1965, *Probiotics : growth-promoting factors produced by microorganisms*. Science (S.U.A). **147**: 747—749.

JAENICKE, R., 1990, *Protein structure and function at low temperatures*. Phil. Trans. R. Soc. London, B, **326**: 535—553.

JAIN, R. LK., SAYLER, G. S., 1987, *Problems and potential for in situ treatment of environmental pollutants by engineered microorganisms*. Microbiol. Sci., **4**: 59—63.

JANKE, D., FRITSCHE, W., 1985, *Nature and significance of microbial cometabolism*. J. basic Microbiol., **25**: 603—619.

JANNASCH, H. W., 1969, *Estimation of bacterial growth rates in natural waters*. J. Bacteriol., **99**: 156 — 160.

JANNASCH, H. W., WIRSEN, C. O., 1977, *Microbiol life in the deep-sea*. Sci. Amer., **236**: 42— — 52.

JANNASCH, H. W., 1979, *Microbial turnover of organic matter in the deep-sea*. Bioscience, **29**: 228 — 232.

JANNASCH, H. W., WIRSEN, C. O., TAYLOR, C. D., 1982, *Deep-sea bacteria : isolation in the absence of decompression*. Science, SUA **216**: 1 315 — 1 317.

JANNASCH, H. W., 1984, *Microbes in the oceanic environment*. Symposia of the Society for General Microbiology. Part II (Kelly D. P., Carr N. G. eds.). Pitman Press Bath., p. 97 — 122.
JANNASCH, H. W., TAYLOR, C. D., 1984, *Deep-sea microbiology*. Ann. Rev. Microbiol., **38**: 487—514.
JANNASCH, H. W., WIRSEN, C. O., 1984, *Variability of pressure adaptation in deep-sea bacteria*. Arch. Microbiol., **139**: 281—288.
JERNELÖV, A., MARTIN, A. L., 1975, *Ecological implications of metal metabolism by microorganism Nr. B 233 Swedish water and air pollution research*. Stockholm, p. 1—31.
JOHANNES, R. E., 1968, *Nutrient regeneration in lakes and oceans*. În: *Advance Microbiology of the Sea* (Droop, M.P., Ferguson-Wood, E.J., eds.).
JOHNSON, F. H., 1957, *The action of pressure and temperature*. Symposium of the Society for General Microbiology. 7 „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 134—167.
JONES, G. E., 1980, *Biogeochemical succesion of bacterial activities in aquatic sediments*. În: *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 348—349.
JOYCE, G. H., DUGAN, P. R., 1970, *The role of floc-forming bacteria in Bod removal from waste water*. În: *Developments in industrial microbiology*, Amer. Inst. Biol. Sci., Washington, p. 377—386.
JULIAN, G. S., BULLA Jr. L.A., SHARPE, E. S., ADAMS, G. L., 1973, *Bacteria, spirochetes and ricketsia as insecticides*. Ann. New York Acad. Sci., **217**: 65—75.
KALMAKOFF, J., MILES, J. A. R., 1980, *Ecological approaches to the use of microbial pathogens in insect control*. Bioscience, **30**: 344—347.
KALSER, M. H., COHEN, R., ARTEAGA, I., YAWN, E., MAYORAL, L., HOFFERT, W. R., FRAZIER, D., 1966, *Normal viral and bacterial flora of the human small and large intestine*. New Engl. J. Med., **274**: 500 — 505, 558 — 563.
KAPLAN, I. R., 1975, *Stable isotopes as a guide to biogeochemical processes*. Proc. R. Soc. London, B, **189**: 183—211.
KARAVAIKO, G. I., 1982, *La lixiviation bactériénne des métaux*. Impact: Science et société, **32**: 213—222.
KARL, M. D., 1980, *Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology*. Microbiol. Rev., **44**: 739—796.
KARL, M. D. 1986, *Determination of in situ microbial biomass, viability, metabolism and growth*. În: *Bacteria in nature*, vol. 2 (Poindexter, J. S., Leadbetter, E. R., eds.). Plenum Press, New York, p. 85—176.
KEEN, N. T., 1986, *Pathogenic strategies of fungi*. În: *Recognition in microbe — plant symbiotic and pathogenic interactions* (Lugtenberg, B., ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 171—188.
KEEN, N. T., STASKAWICZ, B., 1988, *Host range determinants in plant pathogens and symbionts*. Ann. Rev. Microbiol., **42**: 421—440.
KEEN, J. H., MAXFIELD, F. R., HARDEGREE, M. C., HABIG, W. H., 1982, *Receptor — mediated endocytosis of diphteria toxin by cells in culture*. Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A., **79**: 2 912 — 2 916.
KEENEY, D. R., HERBERT R. A., HOLDING, A. J., 1971, *Microbiological aspects of the pollution of fresh water with inorganic nutrients*. În: *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 181 — 199.
p. 181 — 199.
KELLIN, D., 1959, *The problem of anabiosis or latent life: history and current concept*. Proc. Roy. Soc. London, B, p. 149 — 191.
KELLOGG, W. W., CADLE, R. D., ALLEN, E. R., LAZRUS, A. L., MARTELL E. A., 1972, *The sulfur cycle*. Science (S. U.A), **175**: 587 — 596.
KEPPIE, J., 1964, *Host and tissue specificity*. Symposia of the Society for General Microbiology. 14 „Microbial behaviour in vitro", Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 44 — 63.
KESSEL, M., COHEN, Y., 1982, *Ultrastructure of square bacteria from a brine pool in southern Sinai*. J. Bacteriol., **150**: 851 — 860.
KÉTYI, I., 1985, *Toxines as virulence factors of bacterial enteric pathogens*. Acta Microbiol., Hung., **32**: 279 — 304.
KING, H. K., 1966, *Nitrification*. Sci. Progr., Oxford, **54**: 93 — 101.
KING, G. A. M., 1977, *Symbiosis and the evolution of prokaryotes*. Biosystems, **9**: 34 — 42.
KING, G. A. M., 1977, *Symbiosis and the origin of life*. Origins of life, **8**: 39 — 53.
KIRK, T. K., FARREL, R. L., 1987, *Enzymatic „combustion" : the microbial degradation of lignin*. Ann. Rev. Microbiol., **41**: 465 — 505.

KIRK, T. K., 1987, *Enzymatic combustion : the degradation of lignin by white — rot fungi*. În : *Lignin enzymatic and microbial degradation* (Odier, E., ed.). Inra, Paris, p. 51 — 56.
KIRSCHBAUM, J. B., *Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control*. Ann. Rev. Entomol., **30**: 51 — 70.
KISS, S., DRĂGAN-BULARDA, M., RĂDULESCU, D., 1976, *Biological significance of enzymes accumulated in soil*. În : *Advances in Agronomy* (Brady, N. C., ed.). Acad. Press, New York, **27**: 25 — 87.
KISS, S., ȘTEFANIC, G., PASCA, D., DRĂGAN-BULARDA, M., ZBOROVSCHI, E., CRIȘAN, R., 1991, *Enzimologia mediului înconjurător*, Edit. Ceres, București.
KLEINER, D., 1975, *Fixation of atmospheric nitrogen by microorganisms*. Angew. Chem. Internat. Edit., **14**: 80 — 86.
KNOWLES, R., 1982, *Denitrification*. Microbiol. Rev., **46**: 43 — 70.
KNOWLES, B. H., THOMAS, W. E., ELLAR, D. J., 1984, *Lectin-like binding of Bacillus thuringiensis var. kurstaki lepidopteran specific toxin is an initial step in insecticidal action*. FEBS, **168**: 197 — 202.
KNOWLES, B. H., ELLAR, D. J., 1987, *Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of Bacillus thuringiensis — endotoxins with different insect specificity*. Biochim. Biophys. Acta, **924**: 509 — 518.
KOCH, A., 1960, *Intracellular symbiosis in insects*. Ann. Rev. Microbiol., **14**: 121 — 140.
KOCH, A. L., 1984, *How bacteria get their shapes : the surface stress theory*. Comments Mol. Cell. Biophys., **2**: 179 — 196.
KOCH, A. L., 1985, *How bacteria grow and divide in spite of internal hydrostatic pressure*. Canad. J. Microbiol., **31**: 1 071 — 1 084.
KOCH, A. S., 1986, *The evolution of the concept of pathogenicity*. Ann. Immunol. Hung., **26**: 55 — 62.
KOCH, A. L., 1988, *Biophysics of bacterial cell walls viewed as stress — bearing fabric*. Microbiol. Rev., **52**: 337 — 353.
KOCH, A. L., 1990, *Growth and form of the bacterial cell wall*. Amer. Sci, **78**: 327 — 341.
KOCH, A. L., 1990, *Recent extensions of the surface stress theory*. În : *Microbial growth dynamics* (Poole, R. K., Bazin, M. J., Keevie, C., W., eds.). Oxford Univ. Press, p. 39 — 64.
KONINGS, W. N., VELDKAMP, H., 1983, *Energy transduction and solute transport mechanisms in relation to environments occupied by microorganisms*. În : *Microbes in their natural environments* (Slater, J. H., Whittenbury, R., Wimpenny, W. T., eds.). 34th Symposia of the Society General Microbiology, Cambridge, Univ. Press.
KONIJN, T. M., VAN HAASTERT, P. J. M., 1984, *Cell interactions in the cellular slime moulds*. În : *Cellular interactions* (Linskens, H. F., Heslop-Harrison, J., eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 309 — 332.
KORHONEN, T. K., VIRKOLA, R., WESTERLUND, B., TARKKANEN, A. M., LÄTTEENMÄKI, K., SARENEVA, T., PARKKINEN, J., KUUSELA, P., HOLTHÖFER, H., 1988, *Tissue interactions of Escherichia coli adhesins*. Antonie van Leeuwenhoek, **54**: 411 — 420.
KRINSKY, N. I., 1976, *Cellular damage initiated by visible light*. Symposia of the Society for General Microbiology. 26 „The survival of vegetative microbes", Cambridge, Univ. Press, Cambridge, p. 209 — 240.
KRUMBEIN, W. E., 1972, *Rôle des microorganismes dans la génèse, la diagenèse et la dégradation des roches en place*. Rev. Ecol. Sol, **9**: 283 — 319.
KURIHARA, Y., EADIE J. M., HOBSON, P. N., MANN, S. O., 1968, *Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the sheep rumen*. J. Gen. Microbiol., **51**: 267 — 288.
KURSTAK, E., 1978, *Microbial insecticides. Viral and bacterial insecticides : safety considerations*. În : *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 264 — 268.
KUZNETSOV, S. I., DUBININA, G. A., LAPTEVA, N. A., 1979, *Biology of oligotrophic bacteria*. Ann. Rev. Microbial., **33**: 377 — 387.
LAIRD, M., 1973, *Environmental impact of insect control by microrganisms*. Ann. New York, Acad. Sci., **217**: 218 — 226.
LAMANNA, C., SAKAGUCHI, G., 1971, *Botulinal toxins and the problem of nomenclature of simple toxins*. Bacteriol. Rev., **32**: 242 — 249.
LAMBINA, V. A., AFINOGENOVA, A. V., ROMAY, Z., KONOVALOVA, S. M., PUSHKAREVA, A. P., 1982, *Micavibrio admirandus gen et sp. nov*. Mikrobiologhia, **51**: 114 — 117,
LAMBINA, V. A., AFINOGENOVA, A. V., ROMAY, Z., KONOVALOVA, S. M., ANDREEV, L. V., 1983, *A new species of exoparasitic bacteria from the genus Micavibrio destroying Gram-negative bacteria*. Mikrobiologhia, **52**: 777 — 780.

LAMED, R., BAYER, E. A., 1988, *The cellulosome of Clostridium thermocellum*. Adv. Appl. Microbiol., **33**: 1 — 46.
LANHAM, U. N., 1968, *The Blochmann bodies: hereditary intracellular symbionts of insects*. Biol. Rev., **43**: 269 — 286.
LANYI, J. K., 1974, *Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria*. Bacteriol. Rev., **38**: 272 — 290.
LARSEN, H., 1973, *The Halobacteria's confusion to biology*. Antonie van Leeuwenhoek, **39**: 383 — 396.
LAST, F. T., WARREN, R. C., 1972. *Non-parasitic microbes colonizing green leaves : their form and functions*. Endeavour, **31**: 143 — 150.
LAUBIER, L., 1989, *Deep-sea ecosystems based on chemosynthetic processes : recent results on hydrothermal and cold seep biological assemblages. Oceanography* (Ayala-Castanares, A. Wooster, W., Yánez-Arancibia, A., eds.), 1988, p. 129 — 148.
LE RUDULIER L., STROM, A. R., DANDEKAR, A. M., SMITH, L. T., VALENTINE, R.C., 1984, *Molecular biology of osmoregulation*. Science (S. U. A), **224**: 1 064 — 1 068.
LEFEVRE, M., LAPORTE, G. S., 1969, *The „Maladie verte" of Lascaux: diagnosis and treatment*. Studies in Speology, **2**: 35 — 44.
LERECLUS, D., RIBIER, J., KLIER, A., MENOU, G., LECADET, M. M., 1984, *A transposon like structure related to the endotoxin gene of Bacillus thuringiensis*. EMBO J., **3**: 2 561 — 2 567.
LERECLUS, D., LECADET, M. M., KLIER, A., RIBIER, J., RAPOPORT, G., DEDONDER, R., 1985, *Recent aspects of genetic manipulation in Bacillus thuringiensis*. Biochimie, **67**: 91 — 99.
LERECLUS, D., 1988, *Génétique et biologie moléculaire de Bacillus thuringiensis*. Bull. Inst. Pasteur, **86**: 337 — 371.
LEV, M., 1963, *Studies on bacterial associations in germ-free animals and animals with defined floras*. Symposia of the Society for General Microbiology. 13 „Symbiotic associations", Cambridge, Univ. Press, 325 — 334.
LEWIS, D., SWAN, H., 1971, *The role of intestinal flora in animal nutrition*. Symposia of the Society for General Microbiology. 21 „Microbes and biological productivity". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 149 — 175.
LEWIS, D. H., 1974, *Microorganisms and plants : the evolution of parasitism and mutualism*. Symposia of the Society for General Microbiology. 24 „Evolution in the microbial World". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 367 — 392.
LIDSTROM, M. E., 198, *Molecular approaches to problems in biogeochemical cycling*. Antonie van Leeuwenhoek, **55**: 7 — 14.
LIDWELL, O. M., 1967, *Take off of bacteria and viruses*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.), Cambridge, Univ. Press, p. 116 — 137.
LILLY, D. M., STILLWELL, R. H., 1965, *Probiotics : growth promoting factors produced by microorganisms*. Science (S. U. A.), **147**: 747 — 748.
LINCOLN, R. J., BOXSHALL, G. A., CLARK, P. F., 1982, *A dictionary of ecology, evolution and systematics*. Cambridge, Univ. Press.
LOBARZEWSKI, J., 1987, *A lignin-biotransforming peroxidase from Trametes versitolor and its use in immobilized form*. În : *Lignin enzymatic and microbial degradation* (Odier, E., ed.). Inra, Paris, p. 197 — 202.
LONG, S. R., PETERS, N. K., MULLIGAN, J. T., DUDLEY, M. E., FISCHER, R. F., 1986, *Genetic analysis of Rhizobium — plant interactions*. În : *Recognition in microbe — plant symbiotic and pathogenic interactions* (Lugtenberg, B., ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 1 — 17.
LONGWORTH, J. F., KALMAKOFF, J., 1978, *An ecological approach to the use of insect pathogens for pest control*. În : *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 269 — 271.
LORENZ, M. G., AARDEMA, B. W., WACKERNAGEL, W., 1988, *Highly efficient genetic transformation of Bacillus subtilis attached to sand grains*. J. Gen. Microbiol., **134**: 107 — 112.
LOVELL, R., 1957, *The biological influences of man and animals on microbial ecology*. Symposium of the Society for General Microbiology. 7 „Microbial ecology", Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 315 — 327.
LOW, A. J., 1972, *Some aspects of soil structure. Chemistry and Industry*, 373 — 378.
LOW, K. B., PORTER, D. D., 1978, *Modes of gene transfer and recombination in bacteria*, Ann. Rev. Genet., **12**: 249 — 287.

LUCKEY, T. D., 1965, *Gnotobiologic evidence for fonctions of the microflora*. Ernährungsforschung, **10**: 192 — 250.

LUDLAM, F. H., 1967, *The circulation of air, water and particles in the troposphere*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge, Univ. Press, p. 1 — 17.

LUNDGREN, D. G., SILVER, M., 1980, *Ore leaching by bacteria*. Ann. Rev. Microbiol., **34**: 263 — 283.

LUNDGREN, D. G., VALKOVA-VALCHANOVA, M., REED, R., 1986, *Chemical reactions important in bioleaching and bioaccumulation. Biotechnology and Bioengineering*. Symp. No. 16, John Wiley and Sons Inc, New York, p. 7 — 22.

LUTHY, P., 1980, *Insecticidal toxins of Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Letters, **8**: 1 — 7.

LYNCH, J. M., HARPER, S. H. T., 1985, *The microbial upgrading of straw for agricultural use*. Phil. Trans. R. Soc., Londra, B, **310**: 221 — 226.

MACKOWIAK, P. A., 1982, *The normal microbial flora*. New Engl. J. Med., **307**: 83 — 93.

MACLEOD, R. A., CALCOTT, P. H., 1976, *Cold shock and freezing damage to microbes*. Symposia of the Society for General Microbiology. 26 „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, Cambridge, p. 81 — 109.

MACURA, J., 1963, *Interrelations between microorganisms and plant in the rhizosphere*. În : *Plant microbes relationships*. Publ. House, Czechoslovak Acad. Sci., Praga, p. 22 — 33.

MAH, R. A., WARD, D. M., BARESI, L., GLASS, T. L., 1977, *Biogenesis of methane*. Ann. Rev. Microbiol., 31, 309 — 341.

MĂLĂCEA, I., 1969, *Biologia apelor impurificate*. Edit. Academiei, București.

MARTINEZ, J. L., DELGADOIRIBARREN, A., BAGUERA, F., 1990, *Mechanisms o iron acquisition and bacterial virulence*. FEMS Microbiol. Rev., **75**: 19 — 45.

MATIN, A., AUGER, E. A., BLUM, P. H., SCHULTZ, J. E., 1989, *Genetic basis of starvation, survival in nondifferentiating bacteria*. Ann. Rev. Microbiol., **43**: 293 — 316.

MATTHYSSE, A. G., 1983, *Role of bacteria cellulose fibrils in Agrobacterium tumefaciens infection*. J. Bacteriol., **154**: 906 — 915.

MATTHYSSE, A. G., 1986, *Attachement of Agrobacterium tumefaciens, to plant host cells*. În : *Recognition in microbe — plant symbiotic and pathogenic interactions* (Lugtenberg, B., ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 219 — 227.

MAURELLI, A. T., 199, *Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria : a general strategy for human pathogens* ? Microb. Pathogen., **7**: 1 — 10.

MAXHAM, J. V., HICKMAN, H. J., 1974, *Substrate diffusion and uptake within spherical bacterial flocs*, J. Theor. Biol., **43**: 229 — 239.

MAY, K. R., 1967, *Physical aspects of sampling airborne microbes*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge Univ. Press, p. 60 — 80.

MAY, R. M., 1992, *Past efforts and future prospects towards understanding how many species there are*. În : *Biodiversity and global change* (Solbrig, O. T., van Ernden, H. M., van Oordt, P. G. W. J., eds.). IUBS, Monograph No. 8, Paris, p. 70 — 81.

Mc CARTY, P. L., HAUG, R. T., 1971, *Nitrogen removal from waste waters by biological nitrification and denitrification*. În : *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 215 — 232.

Mc COY, J. H., 1971, *Sewage pollution of natural waters*. În : *Microbial aspects of pollutions* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 38 — 50.

Mc COY, J. W., 1980, *Microbiology of cooling water*. Chemical Publ. Co, New York.

MACFADYEN, A., 1968, *The animal habitat of soil bacteria*. În : *The ecology of soil bacteria* (Gray, T. R. G., Parkinson, D., eds.). Liverpool, Univ. Press, p. 66 — 76.

MAC KENZIE, C. R., VAIL, W. J., JORDAN, D. C., 1973, *Ultrastructure of free-living and nitrogen fixing forms of Rhizobium meliloti as revealed by freeze-etching*. J. Bacteriol., **113**: 387 — 393.

Mc NAUGHTON, S. J., WOLF, L. L., 1973, *General ecology*. Holt, Rinehart and Winston Inc., New York.

Mc PHERSON, S. A., PERLAK, F. J., FUCHS, R. L., MARRONE, P. G., LAVRIK, P. B., FISCHHOFF, D. A., 1988, *Characterization of the coleopteran-specific protein gene of Bacillus thuringiensis var. tenebrionis*. Biotechnology, **6**: 61 — 66.

MEREDITH, D. S., 1973, *Significance of spore release and dispersal mechanisms in plant disease epidemiology*. J. Serie Paper, No. 1 564, College of tropical agriculture, Honolulu, Hawaii.

MEŞROBEANU, I., MEŞROBEANU, L., 1965, *Toxinele germenilor Gram-negativi*. Microbiologia, Parazitologia, Epidemiologia, **10**: 461 — 478.

MEYER, F. H., 1974, *Physiology of mycorrhiza*. Ann. Rev. Plant Physiol., **25**: 567 — 586.
MIAN, S., BOND, G., RODRIGUEZ-BARRUECO, C., 1976, *Effective and ineffective root nodules in Myrica faya*. Proc. R. Soc. London, B, **194**: 285 — 293.
MIDDLEBROOK, J. L., DORLAND, R. B., 1984, *Bacterial toxins : cellular mechanisms of action*. Microbiol. Rev., **48**: 199 — 221.
MILBURN, N., 1966, *Fine structure of the pleomorphic bacteroides in the mycetocytes and ovaries of several genera of cockroaches*. J. Insect. Physiol., **12**: 1 245 — 1 254.
MILLER, L. K., LINGG, A. J., BULLA, Jr. L. A., 1983, *Bacterial, viral and fungal insecticides*. Science (S. U. A.), **219**: 715 — 721.
MILLER, T. L., WEAVER, G. A., WOLIN, M. J., 1984, *Methanogens and anaerobes in a colon segment isolated from the normal fecal*. strem. Appl. Environ. Microbiol., **48**: 449 — 450.
MILTENBURGER, H. G., KRIEG, A., 1984, *Bioinsecticides. II. Baculoviridae*. Adv. Biotechnol. Proc., **3**: 291 — 313.
MITCHELL, R., 1971, *Role of predators in the reversal of imbalances in microbial ecosystems*. Nature (Londra), **230**: 257 — 258.
MITCHELL, R., 1980, *Environmental effect, on microbial processes*. În : *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 317 — 320.
MONTICELO, D. J., FINNERTY, W. R., 1985, *Microbial desulfurization of fossil fuels*. Ann. Rev. Microbiol., **39**: 371 — 398.
MOORE, B., 1971, *The health hazards of pollution*. n : *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 11 — 32.
MOORE, N. F., KING, L. A., POSEE, R. D., 1987, *Viruses of insects*. Insect. Sci. Applic., **8**: 275 — 289.
MORIARTY, D. J. W., 1978, *Estimation of bacterial biomass in water and sediments using muramic acid*. În : *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 31 — 33.
MORITA, R. Y., 1966, *Marine psychrophilic bacteria*. Oceanogr. Mar. Biol. Rev., **4**: 105 — 121.
MORITA, R. Y., 1967, *Effects of hydrostatic pressure on marine microorganisms*. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., **5**: 187 — 203.
MORITA, R. Y., 1975, *Psichrophilic bacteria*. Bacteriol. Rev., **39**: 144 — 167.
MORITA, R. Y., 1976, *Survival of bacteria in cold and moderate hydrostatic pressure environments with special reference to psychrophilic and barophilic bacteria*. Symposia of the Society for General Microbiology. 26 „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press., Cambridge, p. 279 — 298.
MORITA, R. Y., 1980, *Low temperature, energy, survival, and time in microbial ecology*. În : *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 323 — 324.
MORITA, R. Y., 1980, *Microbial life in the deep sea*. Canad. J. Microbiol., **26**: 1 375 — 1 385.
MOSHER, D. F., PROCTOR, R. A., 1980, *Binding and factor XIII-mediated cross-linking of a-27 kilodalton fragment of fibronectin to Staphylococcus aureus*. Science (S. U. A.), **209**: 927 — 928.
MOSS, M. O., 1989, *Mycotoxins of Aspergillus and other filamentous fungi*. J. Appl. Bacteriol., Symp. Suppl., 69S — 81S.
MOSSE, B., 1963, *Vesicular-arbuscular mycorrhiza : an extreme form of fungal adaptation*. Symposia of the Society for General Microbiology. 13 „Symbiotic associations", Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 145 — 170.
MOSSE, B., HAYMAN, D. S., 1971, *Plant growth responses to vesicular — arbuscular mycorrhiza. II. In unsterilized field soils*. New Phytol., **70**: 29 — 34.
MOSSE, B., HAYMAN, D. S., ARNOLD, D. J., 1973, *Plant, growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. V. Phosphate uptake by three plant species from P deficient soils labelled with* $^{32}P$. New Phytol., **72**: 809 — 815.
MOSSE, B., 1973, *Plant growth responses to vesicular — arbuscular mycorrhiza. IV. In soil given additional phosphate*. New Phytol., **72**: 127 — 136.
MOSSE, B., 1973, *Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza*. Ann. Rev. Phytopathol., **11**: 171 — 196.
MOSSE, B., 1975, *A microbiologist's view of root anatomy*. În : Soil microbiology (Walker, N., ed.). Butterworth, Londra, p. 39 — 66.
MOULDER, J. W., 1974, *Intracellular parasitism : life in an extreme environment*. J. Infect. Dis., **130**: 300 — 306.
MOULDER, J. W., 1977, *Phagocytosis : the Trojan horse of intracellular parasitism*. Trans. Kans. Acad. Sci., **78**: 105 — 118.

MOULDER, J. W., 1979, *The cell as an extreme environment*. Proc. R. Soc. London, B, **204**: 199 — 210.

MOULDER, J. W., 1985, *Comparative biology of intracellular parasitism*. Microbiol. Rev., **49**: 298 — 337.

MOUNOLOU, J. C., 1992, *Biodiversity at a molecular level*. În: *Biodiversity and global change* (Solbrig, O. T., van Emden, H. M., van Oordt, P. G. W. J., eds.). IUBS, Paris, p. 23 — 39.

MULDER, E. G., LIE, T. A., WOLDENDORP, J. W., 1969, *Biology and soil fertility. Soil biology*. Reviews of research UNESCO, **9**: 163 — 208.

MULDER, E. G., ANTHEUNISSE, J., CROMBACH, W. H. J., 1971, *Microbial aspects of pollution in the food and dairy industries*. În: Microbial aspects of polution (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 71 — 90.

MULDER, E. G., 1972, *Le cycle biologique tellurique et aquatique du fer et du manganèse*. Rev. Ecol. Biol. Sol., **9**: 321 — 349.

MUTHUKUMAR, G., NICKERSON, K. W., 1987, *The glycoprotein toxin of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis indicates a lectin-like receptor in the larval mosquito gut*. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 2 650 — 2 655.

MUSCATINE, L., GREENE, R. W., 1973, *Chloroplasts and algae as symbionts in Molluscs*. Int. Rev.Cytol..**36**: 137 — 169.

MUSCATINE, L., POOL., R. R., TRENCH, R. K., 1975, *Symbiosis of algae and invertebrates: aspects of the symbionts interface*. Trans. Amer. Micros. Soc., **94**: 450 — 469.

MUSCATINE, L., 1989, *Adventures in symbiosis*. Amer. Zool., **29**: 1 203 — 1 208.

NAP, J. P., BISSELING, T., 1990, *Developmental biology of a plant — prokaryote symbiosis : the legume root nodule*. Science, SUA, **250**: 948 — 954.

NEACȘU, P., APOSTOLACHE-STOICESCU, Z., 1982, *Dicționar de ecologie*. Edit. Științifică și Enciclopedică, București.

NESTER, E. W., KOSUGE, T., 1981, *Plasmids specifying plant hyperplasias*. Ann. Rev. Microbiol., **35**: 531 — 565.

NEWELL, P. C., 1976, *How cells communicate : the system used by slime moulds*. Endeavour, **1**: 63 — 68.

NEWMAN, H. N., 1974, *Microbial films in nature*. Microbios, **9**: 247 — 257.

NEWMAN, E. I., 1978, *Root microorganisms : their significance in the ecosystem*. Biol. Rev., **53**: 511 — 554.

NICKERSON, K. W., 1980, *Structure and function of the Bacillus thuringiensis protein crystal*. Biotechnology and Bioengineering, **22**: 1 305.— 1 333.

NIERZWICKI-BAUER, S. A., AULFINGER, H., 1990, *Ultrastructural characterization of Eubacteria residing within leaf cavities of symbiotic and cyanobiont-free Azolla mexicana*. Curr. Microbiol., **21**: 123 — 129.

NIKIFORUK, G., 1985, *Understanding dental caries. Etiology and mechanism basic and clinical aspects*. Karger, Basel.

NOBLE, W. C., *Sampling airborne microbes : handling the catch*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge, Univ. Press, p. 81 — 101.

NORRIS, J. R., 1971, *Microbes as biological control agents*. Symposia of the Society for General Microbiology. 21th „Microbes and general productivity", Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 197 — 229.

NOWOTHY, A., 1969, *Molecular aspects of endotoxic reactions*. Bacteriol. Rev., **33**: 72 — 98.

NUTMAN, P. S., 1963, *Factors influencing the balance of mutual advantage in legume symbiosis*. Symposia of the Society for General Microbiology. 13 „Symbiotic associations", Cambridge, Univ. Press, p. 51 — 71.

NUTMAN, P. S., 1975, *Rhizobium in soil*. În: *Soil microbiology* (Walker, N., ed.). Butterworths, Londra, p. 111 — 131.

NUTMAN, P. S., DYE, M., DAVIS, P. E., 1978, *The ecology of Rhizobium*. În: *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 404 — 410.

OBUKOWICZ, M. G., PERLAK, F. J., KUSANO-KRETZMER, K. K., MAYER, E. J., BOLTEN, S. L., WATRUD, L. S., 1986, *Tn 5-mediated integration of the delta-endotoxin gene from Bacillus thuringiensis into the chromosome of root-colonizing Pseudomonas*. J. Bacteriol., **163**: 982 — 989.

ODIER, E., BUSWELL, J., 1987, *Lignin biodegradation*. În: *Critical Review in Biotechnology* (Stewart, G. G., Russell, I.). CRC Press, Boca Raton, Florida.

ODUM, E. P., 1971, *Fundamentals of ecology*. 3d ed., W. B., Saunders Co., Philadelphia.

OGAWA, J. M., HALL, D. H., KOEPSELL, P. A., 1967, *Spread of pathogens within crops as affected by life cycle and environment*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge, Univ. Press, p. 247 — 267.
OGLESBY, R. T., CHRISTMAN, R. F., DRIVER, C. H., 1967, *The biotransformation of lignin to humus. Facts and postulates*. Adv. in applied. Microbiol., **9**: 171 — 184.
OKAFOR, N., 1966, *Ecology of microorganisms on chitin buried in soil*. J. Gen. Microbiol., **44**: 311 — 327.
OKON, Y., HADAR, Y., 1987, *Microbial inoculants as crop field enhancers*. În: *Critical Review Biotechnology* (Stewart, G. G., Russell, I., eds.). Boca Raton, S. U. A., p. 61 — 127.
OLD, K. M., NICOLSON, T. H., 1978, *The root cortex as part of a microbial continuum*. În: *Microbial ecology* (Loutit M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 291 — 294.
OLSEN, R. A., CLARK, R. B., BENNET, J. H., 1981, *The enhancement of soil fertility by plant roots*. Amer. Sci., **69**: 378 — 384.
OLSEN, G. J., LANE, D. J., GIOVANNONI, S. J., PACE, N. R., 1986, *Microbial ecology and evolution : a ribosomal RNA approach*. Ann. Rev. Microbiol., **40**: 337 — 365.
OLSNES, S., STENMARK, H., MOSKAUG, M., FIVIND, J., MC GILL, S. MADSHUS, I. H., SANDVIG, K., 1990, *Protein toxins with intracellular targets*. Microbial Pathog., **8**: 163 — 168.
OPPENHEIMER, C. H., 1965, *Bacterial production of hydrocarbon-like materials*. Zeitschr. Allg. Mikrobiol., **5**: 285 — 307.
ORLITA, A., 1968, *Biodeterioration in the leather industry*. În: *Biodeterioration of materials. Microbiological and allied aspects* (Walters, A. H., Elphick, J. J., eds.). Elsevier Publ. Co., Londra, p. 297 — 301.
ORMEROD, J. G., 1983, *The carbon cycle in aquatic ecosystems*. Symposia of the Society for General Microbiology, 34 „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 463 — 482.
OUAISSI, M. A., CAPRION, A., 1985, *Fibronectines : structures et fonctions*. Ann. Inst. Pasteur, Immunol., **136 C**: 169 — 185.
OUAISSI, M. A., CORNETTE, J. AFCHAIN, D., CAPRON, A., GRAS-MASSE, H., TARTAR, A., 1986, *Trypanosoma cruzi infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain*. Science, SUA, **234**: 603 — 607.
OWEN, P., 1988, *Outer membrane proteins : their role in virulence*. În: *Immunochemical and molecular genetic analysis of bacterial pathogens* (Owen, P., Foster, T. J., eds.). Elsevier Science Publ., Londra.
PAERL, H. W., KELLAR, P. E., 1978, *Optimization of $N_2$ — fixation in $O_2$ — rich waters*. În: *Microbial ecology* (Loutit M. W., Miles, J. A. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 68 — 75.
PAINTER, H. A., 1974, *Biodegradability*, Proc. R. Soc., London, B, **185**: 149 — 158.
PANOS, C., AJL, S. J., 1963, *Metabolism of microorganisms as related to their pathogenicity*. Ann. Rev. Microbiol., **17**: 297 — 328.
PARK, D., 1972, *On the ecology of heterotrophic microorganisms in fresh-water*. Trans. Br. Mycol. Soc., **58**: 291 — 299.
PECK, JR. H. D., 1974, *The evolutionary significance of inorganic sulfur metabolism*. 24. Symposium of the Society for General Microbiology. „*Evolution in the microbial world*". Cambridge, Univ. Press, p. 242 — 262.
PEIXOTO, J. P., KETTANI, M. A., 1973, *The control of the water cycle*. Sci. Amer., **228**: 46 — 60.
PELCZAR, M. J., REID, R. D., CHAN, E. C. S., 1977, *Microbiology*. 4. Mc Graw-Hill Book Co., New York.
PELOUX, Y., 1985, *Les bactéries opportunistes*. Ann. Biol. Clin., **43**: 153 — 155.
PICHINOTY, F., 1973, *La réduction bacterienne des composés oxygénés minéraux de l'azote*. Bull. Inst. Pasteur, **71**: 317 — 395.
PIKE, E. B., CURDS, C. R., 1971, *The microbial ecology of the activated sludge process*. În: *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 123 — 147.
PILPEL, N., 1968, *The natural fate of oil on the sea*. Endeavour, **27**: 11 — 13.
PLEASANTS, J. R., 1973, *Germ-free animals and their significance*. Endeavour, **117**: 112 — 116.
POCHON, J., TARDIEUX, P., LAJUDIE, J., CHARPENTIER, M., DELVERT J., TRIAV, R., BRÉDILLET, M., 1960, *Dégradation des temples d'Angkor et processus biologiques*. Ann. Inst. Pasteur, **98**: 457 — 461.
POCHON, J., 1968, *Facteur biologiques de l'alteration des pierres*. În: *Biodeterioration of materials. Microbiological and applied aspects* (Walter, A. H., Elphick, J. J., eds.). Elsevier Publ. Co., Co. Londra, p. 258 — 268.

POLLARD, M., 1964, *Germ-free animals and biological research*. Science (S. U. A.), **145**: 247 — 251.
POMEROY, L. E., 1980, *Microbial effects of aquatic food wels*. În: *Microbiology* — 1980 (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 325 — 327.
POOLEY, F. D., 1982, *Bacteria accumulate silver during leaching of sulphide ore minerals*. Nature (Londra), **296**: 642 — 643.
POP, I., HODIȘAN, I., MITITELU, D., LUNGU, L., CRISTUREAN, I., MIHAI, G., 1983, *Botanica sistematică*. Edit. Didactică și Pedagogică, București.
PORTER, K. G., 1976, *Enhancement of algal growth and productivity by grazing zooplankton*. Science, SUA, **192**: 1 332 — 1 334.
POSTGATE, J. R., 1974, *Evolution within nitrogen-fixing systems*. Symposia of the Society for General Microbiology. 24 „Evolution in the microbial world". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 263 — 288.
POSTGATE, J. R., 1974, *New advances and future potential in biological nitrogen fixation*. J. Appl. Bact., **37**: 185 — 202.
POSTGATE, J. R., 1976, *Death in macrobes and microbes*. Symposia of the Society for General Microbiology. 26 „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, p. 1 — 18.
POSTGATE, J. R., 1979, *The sulphate-reducing bacteria*. Cambridge, Univ. Press.
POSTGATE, J. R., 1980, *Prospects for the exploitation of biological nitrogen fixation*. Phil. Trans. R. Soc. London. B, **290**: 421 — 425.
POSTGATE, J. R., CANNON, F. C., 1981, *The molecular and genetic manipulation of nitrogen fixation*. Phil. Trans. R. Soc. London, B, **292**: 589 — 599.
POURRIOT, R., 1966, *Métabolites externes et interactions biochimiques chez les organismes aquatiques*. Ann. Biol., **5**: 338 — 374.
POWLSON, D. S., 1975, *Effects of biocidal treatments on soil organisms*. În: *Soil microbiology* (Walker, N., ed.). Butterworths, Londra, p. 193 — 224.
PRAMER, D., 1964, *Nematode — trapping fungi*. Science (S. U. A.), **144**: 382 — 388.
PRAMER, D., AL-RABIAI, S., 1973, *Regulation of insect populations by protozoa and nematodes*. Annal., New York, Acad. Sci., **217**: 85 — 92.
PREER, Q. B., 1969, *Alpha, an infections macronuclear symbiont of Paramecium aurelia*. J. Protozool., **16**: 570 — 578.
QUASTEL, J. H., 1965, *Soil metabolism*. Ann. Rev. Plant Physiol., **16**: 217 — 240.
RAETZ, C. R. H., 1990, *Biochemistry of endotoxins*. Ann. Rev. Biochem., **59**: 129 — 170.
RALTON, J. E., SMART, M. G., CLARKE, A. E., 1987, *Recognition and infection processes in plant pathogens interactions*. În: *Plant — microbe interactions*, vol. 2, *Molecular and genetic perspectives* (Kosuge, T., Nester, W. E., eds.). Macmillan Publ. Co., Londra, p. 217 — 252.
RAYNAUD, M., ALOUF, J. E., 1970, *Intracellular versus extracellular toxins*. În: *Microbial toxins* (Ajl, S. J., Kadis, S., Montie, T. C., eds.). Acad. Press, New York, vol. I, *Bacterial protein toxins*, p. 67 — 117.
REANNEY, D. C., GOWLAND, P. C., SLATER, J. H., 1983, *Genetic interactions among microbial communities*. Symposia of the Society for General Microbiology. 34 „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra p. 379—422.
ROVIRA, A. D., 1965, *Interactions between plant roots and soil microorganisms*. Ann. Rev. Microbiol., **19**: 241 — 266.
REHÁCEK, J., 1965, *Development of animal viruses and rickettsiae in ticks and mites*. Ann. Rev. Entomol., **10**: 1 — 24.
REINEKE, W., KNACKMUSS, H. J., 1988, *Microbial degradation of haloaromatics*. Ann. Rev. Microbiol., **42**: 263 — 287.
REISSER, W., WIESSNER, W., 1984, *Autotrophic eukaryotic fresh-water symbionts*. În: *Cellular interactions* (Linskens, H. F., Heslop-Harrison, J., eds.). Springer-Verlag, New York, p. 59 — 74.
REISSER, W., 1984, *Endosymbiotic Cyanobacteria and cyanellae*. În: *Cellular interactions* (Linskens, H. F., Heslop-Harrison, J., eds.). Springer-Verlag, New York, p. 91 — 112.
REMACLE, J., 1970, *La microflore des litières*. Bull. Soc. Roy Bot., Belgique, **103**: 83 — 96.
RESMERIȚĂ, I., RAȚIU, O., 1979, *Interrelații între microorganisme—plante verzi în sistemul microbiocenoze — fitocenoze. Contribuții botanice*. Grădina Botanică, Univ. Babeș—Bolyai, Cluj-Napoca.
RICHARDS, K. L., DOUGLAS, S. D., 1978, *Pathophysiological effects of Vibrio cholerae and enterotoxigenic Escherichia coli and their exotoxins on eucaryotic cells*. Microbiol. Rev., **42**: 592 — 613.

RILEY, M., 1989, *Constancy and change in bacterial genomes.* În : *Bacteria in nature*, vol.3 (Poindexter, J. S., Leadbetter, E. R., eds.). Plenum Publ. Co., New York p. 359 — 388.
RITTENBERG, S. C., SHILO, M., 1970, *Early host damage in the infection cycle of Bdellovibrio bacteriovorus.* J. Bacteriol., **102**: 149 — 160.
RISHBETH, J., 1988, *Biological control of air-borne pathogens.* Phil. Trans. R. Soc., London, B, **318**: 265 — 281.
ROBINSON, K., 1971, *Aerobic treatment of agricultural wastes.* În: *Microbial aspects of pollution* (Sykes, H., Skinner, F. A., eds.). New York, p. 91 — 102.
ROBSON, L. M., CHAMBLISS, G. H., 1989, *Cellulases of bacterial origins.* Enzyme Microbiol. Technol., **11**: 626 — 644.
ROGOFF, M. H., YOUSTEN, A. A., 1969, *Bacillus thuringiensis : microbiological considerations.* Ann. Rev. Microbiol., **23**: 357 — 386.
ROLFE, B. G., REDMOND, J. W., BATLEY, M., CHEN, H., DJORDJEVIC, S. P., RIDGE, R. W., BASSAM, B. J., SARGENT, C. L., DAZZO, F. B., DJORDJEVIC, M. A., 1986, *Intercellular communication and recognition in the Rhizobium — legume symbiosis* (Lugtenberg, B., ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 39 — 54.
ROSE, A. H., 1976, *Osmotic stress and microbial survival.* Symposia of the Society for General Microbiology. 26 „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, p. 155 — 182.
ROSS, R. T., 1963, *Microbiology of paint films.* Adv. Appl. Microbiol., **5**: 217 — 233.
ROSS, R. T., SLADEN, J. R., WIENART, L. A., 1968, *Biodeterioration of paint and paint films* În : *Biodeterioration of materials. Microbiological and allied aspects* (Walters, A. H., Elphick, J. J., eds.). Elsevier Publ. Co, Londra, p. 317 — 325.
ROSZAK, D. B., COLWELL, R. R., 1987, *Survival strategies of bacteria in the natural environment.* Microbiol. Rev., **51**: 365 — 379.
ROSWALL, T., 1980, *Aquatic microbial ecology — Concepts and trends.* În : *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 384 — 389.
ROTIMI, V. O., DUERDEN, B. I., 1981, *The development of the bacterial flora in normal neonates.* J. Med. Microbuol., **14**: 51 — 62.
ROVIRA, A. D., CAMPBELL, R., 1974, *Scanning electron microscopy of microorganisms on the roote of wheat.* Microbiol., Ecol., **1**: 15 — 23.
ROWBURY, R. J., ARMITAGE, J. P., KING, C., 1983, *Movement, taxes and celular interactions-in the response of microorganisms to the natural environment.* Symposia of the general Society for General Microbioloy. 34 „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra p. 299 — 350.
ROWE, G. E., MARGARIRTIS, A., 1987, *Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by Bacillus thuringiensis.* În : *Critical Review Biotechnology* (Stewart, G. G., Russel, I., eds.). Boca Raton, S. U. A., p. 87 — 127.
RUEHLE, J. L., MARX, D. H., 1979, *Fibres food, fuel and fungal symbionts.* Science, SUA, **206**: 419 — 422
RUOSLAHTI, E., PIERSCHBACHER, M. D., 1987, *New perspectives in cell adhesion : RGD and integrins.* Science (S. U. A.), **238**: 491 — 497.
RUSSEL, J., 1963, *The soil as a habitat for life.* The Smithsonian Report, 449 — 456.
RUSSEL, E. W., 1971, *Soil structure : its maintenance and improvement.* J. Soil. Sci., **22**: 137 — 151.
RUSSEL, N. J., 1990, *Cold adaptation of microorganisms.* Phil. Trans. Roy Soc. London, B, Biol. Sci., **326**: 595 — 613.
RYTHER, J. H., GOLDMAN, J. C., 1975, *Microbes as food in mariculture.* Ann. Rev. Microbiol., **29**: 429 — 443.
SAARI, L. L., LUDDEN, P. W., 1987, *The energetics and energy costs of symbiotic nitrogen fixation.* În : *Plant — microbe interactions. Molecular and genetic perspectives* (Kosuge, T., Nester, E. W., eds.), vol. 2, Macmilan Publ. Co., New York, p. 147 — 193.
SACCHI, V. F., PARENTI, P., HANOZET, G. M., GIORDANA, S., LÜTHY, P., WOLFERSBERGER, M. G., 1986, *Bacillus thuringiensis toxin inhibits K+ — gradient dependent aminoacid transport across the brush border membrane of Pieris brassicae midgut cells.* FEBS, 3 904, **204**: 213 — 218.
SAHLMAN, K., FAHRAEUS, G., 1963, *An electron microscope study — of root-hair infection by Rhizobium.* J. Gen. Microbiol., **33**: 425 — 427.
SATIR, P., 1974, *How cilia move.* Sci. Amer. **231**: 45 — 52.
SAVAGE, D. C., 1972, *Survival on mucosal epithelia, epithelial penetration and growth in tissues of pathogenic bacteria.* Symposia for General Microbiology. 22, „Microbial pathogenicity in man and animals". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 25 — 57.

SAVAGE, D. C., 1977, *Microbial ecology of the gastrointestinal tract*. Ann. Rev. Microbiol., **31**: 107 — 133.

SAVAGE, D. C., 1978, *Microorganisms and the gastrointestinal tract. Gastrointestinal microecology : one opinion*. În : *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 234 — 239.

SAVAGE, D. C., 1986, *Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition*. Ann. Rev. Nutr., **6**: 155 — 178.

SAVORY, J. G., 1968, *Microbial attack of timber and allied constructional materials*. În : *Biodeterioration of materials. Microbiological and allied aspects* (Walters, A. H., Elphick, J. J., eds.). Elsevier Publ. Co. Ltd., Londra, p. 403 — 407.

SCHIPPERS, B., VAN VUURDE, J. W. L., 1978, *Studies of microbial colonization of wheat roots and the manipulation of the rhizosphere microflora*. În : *Microbial Ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 295 — 298.

SCHIPPERS, B., 1988, *Biological control of pathogens with rhizobacteria*. Phil. Trans. R. Soc. London, B, **318**: 283 — 293.

SCHOPF, J. W., FORD, T. D., BREED, W. J., 1973, *Microorganisms from the Late Precambrian of the Grand Canyon, Arizona*. Science (S. U. A.), **179**: 1 319 — 1 321.

SCHLECHT, S, FROMME, I., 1975, *Chemische und serologische Eigenschaften von Salmonella Lipopolysacchariden ausunter schiedlichen Wachstumphasen*. Zbl. Bakt.Hyg., I, Abt. Orig., A, **233**: 199 — 222.

SCHWEMMLER, W., 1980, *Endocytobiosis : general principles*. Biosystems, **12**: 111 — 122.

SELBY, K., 1967, *The biodeterioration of cotton textiles and its prevention*. Monograph No. 23, Soc. Chemical Ind. Leather head, Anglia, p. 201 — 208.

SEQUEIRA, L., 1984, *Plant — bacterial interactions*. În : *Celular interactions* (Linskens, H. F., Harrison-Heslop J., eds.). Springer-Verlag, Berlin, New York, p. 186 — 211.

SHAH, D. B., COULMAN, G. A., 1978, *Kinetics of nitrification and denitrification reactions*. Biotechnology and Bioengineering, **20**: 43 — 72.

SHANDS, Jr. J. W., GRAHAM, J. A., NATH, K., 1967, *The morphologic structure of isolated bacterial lipopolysaccharide*. J. Mol. Biol., **25**: 15 — 21.

SHANMUGAM, K. T., VALENTINE, R. C., 1975, *Molecular biology of nitrogen fixation*. Science (S. U. A.), **187**: 919 — 924.

SHEPHERD, C. J., 1957, *The genome as a component of the ecosystem*. Symposium of the Society for General Microbiology. VII. Microbial ecology. Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 1 — 21.

SHILO, M., 1973, *Rapports entre Bdellovibrio et ses hôtes. Nature de la dépendance*. Bull. Inst. Pasteur, **71**: 21 — 31.

SHILO, M., 1980, *Factors that affect distribution patterns of aquatic microorganisms*. În : *Microbiology* — 1980 (Schlessinger, D., ed.), Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C., p.311— 313.

SHIMKETS, L. J., 1989, *The role of the cell surface in social and adventurous behaviour of myxobacteria*. Molec. Microbiol., **3**: 1 295 — 1 298.

SILVER, W. S., POSTGATE, J. R., 1973, *Evolution of asymbiotic nitrogen fixation*. J. theor. Biol., **40**: 1 — 10.

SILVERMAN, G. J., DAVIS, N. S., KELLER, W. H., 1964, *Exposure of microorganisms to simulated extraterrestrial space ecology*. În : *Life science and space research* (Florkin, M, Dollfus, A., eds.). North-Holland Publ. House, Amsterdam, p. 372 — 384.

SILVERMAN, M. P., EHRLICH, H. L., 1964, *Microbial formation and degradation of minerals*. Adv. Appl. Microbiol., **6**: 153 — 205.

SINGLETON, Jr. R., AMELUNXEN, R. E., 1973, *Proteins from thermophilic microorganisms*. Bacteriol. Rev., **37**: 320 — 342.

SKINNER, F. A., 1975, *Anaerobic bacteria and their activities in soil*. În : *Soil microbiology* (Walker, N., ed.). Butterworths, Londra, p. 1 — 19.

SLATER, J. H., 1980, *Physiological and genetic implications of mixed population and microbial community growth*. În : *Microbiology* — 1980 (Schlessinger, D., ed.), Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 314 — 316.

SMITH, D. C., 1963, *Experimental studies of lichen physiology*. Symposia of the Society for General Microbiology. 13,,Symbiotic associations''. Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 31 — 50.

SMITH, D., MUSCATINE, L., LEWIS, D., 1969, *Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis*. Biol. Rev., **44**: 17 — 90.

SMITH, H., 1972, *The little — known determinants of microbial pathology*. Symposia for General Microbiology. 22,,Microbial pathogenicity in man and animals''. Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 1 — 24.

SMITH, H., 1976, *Survival of vegetative bacteria in animals*. Symposia of the Society for General Microbiology. 26 „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, Cambridge, p. 299 — 326.
SMITH, H., 1977, *Microbial surfaces in relation to pathogenicity*. Bacteriol. Rev., **41**: 475 — 500.
SMITH, S. S. E., 1980, *Mycorrhizas of autotrophic higher plants*. Biol. Rev., **55**: 475 — 510.
SMYTH, C. J., 1978, *Flagella : their role in virulence*. În : *Immunochemistry molecular genetic analysis bacterial pathology* (Owen, P., Foster, T. J., eds.). Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, p. 3 — 11.
SMYTH, C. J., 1988, *Fimbriae : their role in virulence*. În : *Immunochemistry, molecular genetic analysis bacterial pathology* (Owen, P., Foster, T. J., eds.). Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, p. 13 — 25.
SMITH-MAYNARD, J., 1989, *Generating novelty by symbiosis*. Nature (Londra), **341**: 284—286.
SNEATH, P. H. A., 1962, *Longevity of microorganisms*. Nature, Londra, **195**: 643 — 646.
SNEATH, P. H. A., 1964, *The limits of life*. Discovery, **25**: 20 — 24.
SOBIESZCZANSKI, 1986, *Importance of the rhizosphere in plant — microbe interactions*. În : *Biotechnology : potentials and limitations* (Silver, S., ed.). Dahlem Konferenzen, Springer-Verlag, Berlin, p. 275 — 282.
SOLBRIG, O. T., 1992, *Biodiversity : an introduction*. În : *Biodiversity and global change* (Solbrig, O. T., van Emden, H. M., van Oordt, P. G. W. J., eds.). IUBS, Paris, p. 13 — 20.
SPAINK, H. P., WIJFFELMAN, C. A., PEES, E., OKKER, R. J., H., LUGTENBERG, B. J. J., 1987, *Rhizobium nodulation gene nod D as a determinant of host specificity*. Nature (Londra), **328**: 337 — 340.
SPENSLEY, P. C., 1963, *Aflatoxin, the active principle in turkey „X" disease*. Endeavour, **22**: 75 — 79.
SPRENT, J. I., RAVEN, J. A., 1985, *Evolution of nitrogen fixing symbiosis*. Proc. R. Soc. Edinburg, B, **85**: 215 — 237.
SPRENT, J. I., SUTHERLAND, J. M., DE FARIA, S. M., 1987, *Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms*. Phil. Trans. R. Soc. London, B, **317**: 111 — 129.
SPRINGER, T. A., 1990, *Adhesion receptors of the immune system*. Nature (Londra), **346**: 425—434.
SRERE, P. A., MOSBACH, K., 1974, *Metabolic compartimentation : symbiotic organellar, multienzymatic, and microenvironmental*. Ann. Rev. Microbiol., **28**: 61 — 83.
STACHEL, S. E., ZAMBRYSKI, P. C., 1989, *Genetic trans-kingdom sex ?* Nature, Londra, **340**: 190 — 191.
STAIRS, G. R., 1972, *Pathogenic microorganisms in the regulation of forest insect populations*. Ann. Rev. Entomol., **17**: 355 — 372.
STEINHAUS, E. A., 1963, *Insect Pathology. An advanced treatise*. vol. 1, 2, Academic Press, New York.
STALEY, J. T., 1980, *Diversity of aquatic heterotrophic bacterial communities*. În : *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.), Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 321 — 322.
STANDEAST, A. F. B., 1964, *The correlation of properties in vitro with host — parasite relations*. Symposia of the Society for General Microbiology. 14 „Microbial behaviour *in vitro* and *in vivo*". Oxford Univ. Press, p. 64 — 84.
STANIER, R. Y., COHEN-BAZIRE, G., 1957, *The role of light in the microbial world : some facts and speculations*. Symposium of the Society for General Microbiology. 7 „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra", p. 56 — 89.
STARR, M. P., SKERMAN, V. B. D., 1965, *Bacterial diversity : the natural history of selected morphologically unusital bacteria*, Ann. Rev. Microbiol., **19**: 407 — 454.
STARR, M. P., BAIGENT, N. L., 1966, *Parasitic interaction of Bdellovibrio bacteriovorus with other bacteria*. J. Bacteriol., **91**: 2 006 — 2 017.
STARR, M. P., SEIDLER, R. J., 1971, *The Bdellovibrios*. Ann. Rev. Microbiol., **25**: 649 — 678.
STEEL, J. A., 1971, *Factors affecting algal blooms*. În : *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F. A., eds.). Acad. Press, New York, p. 201 — 214.
ȘTEFĂNESCU, L., 1978, *Umflarea nămolului activ din stațiile de epurare biologică și orientări privind combaterea ei*. CNA, ICPGA, București, p. 1 — 51.
STEIN, J. L., 1984, *Subtidal gastropods consume sulfur-oxiding bacteria : evidence from coastal hydrothermal vents*. Science (S. U. A.), **223**: 696 — 698.
STEPHEN, A. M., CUMMINGS, J. H., 1980, *The microbial contribution to human fecal mass*. J. Med. Microbiol., **13**: 45 — 56.
STERN, A. M., 1980, *Role of microorganisms in environmental assessments*. În : *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.), Amer. Soc. for Microbiol., Washington D. C., p. 361 — 365.
STERNER, R. W., 1986, *Herbivores direct and indirect effects on algal populations*. Science (S. U. A.), **231**: 605 — 607.

STETTER, K. O., FIALA, G., HUBER, R., SEGERER, A., 1990, *Hyperthermophilic microorganisms*. FEMS, Microbiol. Rev., **75**: 117 — 124.
STEVENSON, I., 1969, *The Biochemical status of μ particles in Paramecium aurelia*. J. Gen. Microbiol., **57**: 61 — 75.
STEWART, W. D. P., 1969, *Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living microorganisms*. Proc. Roy Soc., Londra, B, **172**: 367 — 388.
STEWART, W. D. P., 1973, *Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms*. Ann. Rev. Microbiol., **27**: 283 — 316.
STEWART, W. D. P., 1976, *Nitrogen fixation*. Phil. Trans. R. Soc. London, B, **274**: 341 — 358.
STEWART, W. D. P., 1977, *Present day nitrogen fixing plants*. Ambio, **6**: 166 — 173.
STEWART, W. D. P., 1983, *Natural environments challenges to microbial success and survival*. Symposia of the Society for General Microbiology. 34 „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 1 — 35.
STEWART, G. J., CARLSON, C. A., 1986, *The biology of natural transformation*. Ann. Rev. Microbiol., **40**: 211 — 235.
STOLP, H., STARR, M. P., 1965, *Bacteriolysis*. Ann. Rev. Microbiol., **19**: 79 — 104.
STOLP, H., 1969, *Bdellovibrio bacteriovorus : ein intrazellulären. Bakterienparasit* Ärtzl. Praxis, **21**: 2 293 — 2 297.
STOLP, H., 1973, *The Bdellovibrios : bacterial parasites of bacteria*. Ann. Rev. Phytopathol., **11**: 53 — 76.
SEAWARD, M. R. D., CROSS, T., UNSWORTH, B. A., 1976, *Viable bacterial spores recovered from an archaeological excavation*. Nature, Londra, **261**: 407 — 408.
STOLZY, L. H., VAN GUNDY, S. D., 1968, *The soil as an environment for microflora and microfauna*. Phytopathology, **58**: 889 — 899.
STONER, H. B., 1972, *Specific and non-specific effects of bacterial infection on the host*. Symposia of the Society for General Microbiology. 22 "Microbial pathogenicity in man and animals". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 113 — 128.
STRANGE, R. E., COX, C. S., 1976, *Survival of dried and air-borne bacteria*. Symposia of the Society for General Microbiology. 26, „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, p. 111 — 154.
STREICHER, S. L., VALENTINE, R. C., 1973, *Comparative biochemistry of nitrogen fixation*. Ann. Rev. Biochem., **42**: 279 — 302.
STRICKLAND, J. D. H., 1971, *Microbial activity in aquatic environmental*. Symposia of the Society for General Microbiology. 21, „Microbes and biological productivity". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 231 — 253.
STROBEL, G. A., 1974, *Phytotoxins produced by plant parasites*. Ann. Rev. Plant Physiol., **25**: 541 — 566.
STUGREN, B., 1975, *Ecologie generală*. Editura Didactică și Pedagogică, București.
STURDZA, S. A., 1968, *Contributions roumaines à la connaisance de la distribution des bactériophages dans le milieu extérieur*. Rev. Roum. d'Inframicrobiol., **5**: 145 — 162.
SUMMERS, A. O., SILVER, S., 1978, *Microbial transformations of metals*. Ann. Rev. Microbiol., **32**: 637 — 672.
SWINNERTON, J. W., LINNENBOM, V. J., LAMONTAGUE, R. A., 1970, *The ocean: a natural source of carbon monoxide*. Science, SUA, **167**: 984 — 986.
TABAQCHALI, S., BOOTH, C. C., 1967, *Relationship of the intestinal bacterial flora to absorbtion*. Brit. Med. Bull., **23**: 285 — 290.
TABER, W. A., 1976, *Wastewater microbiology*. Ann. Rev. Microbiol., **30**: 263 — 277.
TAYLOR, D. L., 1973, *Algal symbionts of invertebrates*. Ann. Rev. Microbiol., **27**: 171 — 187.
TAYLOR, G. R., 1974, *Space microbiology*. Ann. Rev. Microbiol., **28**: 121 — 137.
TAYLOR, C. E., MUSCATINE, L., JEFFERSON, D. R., 1989, *Maintenance and breakdown of the Hydra — Chlorella symbiosis : a computer model*. Proc. R. Soc. London, B, **238**: 277 — 289.
TAYSUM, D. H., 1968, *Microbiological deterioration of latex and raw rubber*. Monograph No. 23, Soc. Chem. Ind. Leatherhead, Anglia, p. 105 — 120.
TEMPEST, D. W., NEIJSSEL, O. M., ZEVENBOOM, W., 1983, *Properties and performance of microorganisms in laboratory culture : their relevance to growth in natural ecosystems*. Symposia of the Society for General Microbiology. 34 „Microbes in their natural environments. Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 119 — 151.
TENG, P. S., BLACKIE, M. L., CLOSE, R. C., 1978, *Systems analysis as a strategy for agroecosystem managements : the barley leaf rust epidemic*. În : *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 350 — 352.
THIÉBAUD, M., LAJUDIE, J., 1963, *Associations bactériennes et altérations biologiques des monuments en pierre calcaire*. Ann. Inst. Pasteur, **105**: 353 — 358.

TIETJEN, J. H., 1980, *Microbial meiofaunal interrelationship : a review.* În : *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.), Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 335—338.
TINKER, P. B., 1986, *Conditions in the rhizosphere in relation to microbial development.* În : *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions* (Lugtenberg, B., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 413—421.
TINSLEY, T. W., 1977, *Viruses and the biological control of insect Pests.* Bioscience, **27** : 659—661.
TINSLEY, T. W., 1978, *Use of insect pathogenic viruses as pesticidal agents.* În : *Perspectives in Virology* (Pollar, M., ed.). Raven Press, New York, p. 199—210.
TOMASZ, A., 1974, *The role of autolysins in cell death.* Ann. New York, Acad. Sci., **235** : 439—447.
TORREY, J. G., 1978, *Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms.* Bioscience, **28** : 586—592.
TORMA', A. E., BOSECKER, K., 1982, *Bacterial leaching.* Progr. Ind. Microbiol., **16** : 77—118.
TRAXLER, R. W., 1962, *Microbial degradation of asphalt.* Biotechnology and Bioengineering, **4** : 369—376.
TRECCANI, V., 1965, *La degradazione microbica dei idrocarburi e dei detergenti di sintesi.* Ann. Ist. Super. Sanità, **1** : 805—919.
TRECCANI, V., 1965, *Microbial degradation of aliphatic and aromatic hydroccarbons.* Zeitschr,. Allg. Microbiol., **5** : 332—341.
TRECCANI, V., 1967, *La degradazione microbiologica dei detergenti.* La Riv. Ital. Sost. Grasse, **10** : 511—514.
TRIBE, H. T., 1957, *Ecology of microorganisms in soils as observed during their development upon buried cellulose film.* Symposia of the Society for General Microbiology. 7 „Microbial ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 287—297.
TRIBE, H. T., 1963, *The microbial component of humus.* În : *Soil organisms* (Doeksen, J., van der Drift, J., eds.), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, p. 205—211.
TRINCI, A.P.J., THURSTON, C. F., 1976, *Transition to the nongrowing state in eukaryotic microorganisms.* În : Symposia of the Society for General Microbiology. 26 „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, p. 55—80.
TU, J. C., BRAYBROOK, G., 1981, *Structural organization of the rhizobial root nodule of clover.* Microbios, **32** : 77—88.
TUOVINEN, O. H., 1972, *Microbiological aspects in the leaching of uranium by Thiobacillus ferrooxidans.* Atomic energy review, **10** : 251—258.
TUOVINEN, O. H., KELLY, D. P., 1972, *Biology of Thiobacillus ferrooxidans in relation to the microbiological leaching of sulphide ores.* Zeitschr. Allg. Microbiol., **12** : 311—346.
TYLDESLEY, J. B., 1967, *Movements of particles in the lower atmosphere.* 17. Symposium of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge, Univ. Press, p. 18—30.
TYRRELL, D. A. J., 1967, *The spread of viruses of the respiratory tract by the airborne route.* 17. Symposia of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P.H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge, Univ. Press, p. 286—306.
TWEETEN, K. A., BULLA, L. A. JR., CONSIGLI, R. A., 1981, *Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses.* Microbiol. Rev., **45** : 379—408.
VAN ANDEL, J. G., BREURE, A.M., 1984, *Anaerobic waste water treatment.* Trends in Biotechnology, **2** : 16—20.
VAN BERKUM, P., BOHLOOL, B. B., 1980, *Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses.* Microbiol. Rev., **44** : 491—517.
VAN EGERAAT, A. W.S.M., 1978, *Root exudates of pea seedling and their effect upon Rhizobium leguminosarum.* În : *Microbial ecology* (Loutit, M. W., Miles, J. R., eds.). Springer-Verlag, Berlin, p. 385—389.
VAN ES., F. B., LAANBROEK, H. J., VELDKAMP, H., 1984, *Microbial ecology : an overview.* În : *Aspects of microbial metabolism and ecology* (Codd, G. A., ed.). Acad. Press, Londra, p. 1—33.
VAN FURTH, R., GUIOT, H. F. L., 1988, *Modulation of the host flora.* În : *Perspectives in antiinfective therapy* (Jackson, G. G., Schlumberger, H. D., Zeiler, H. J., eds.). F. Vieweg and sohn Braunschweig, Wiesbaden.
VON GRAEVENITZ, A., 1977, *The role of opportunistic bacteria in human disease.* Ann. Rev. Microbiol., **31** : 447—471.
VAN HEYNINGEN, W. E., ARSECULERATNE, S. N., 1964. *Exotoxins.* Ann. Rev. Microbiol., **18** : 195—216.
VAN HEYNINGEN, W. E., 1970, *General characteristics.* În : *Microbial toxins*, vol. I, *Bacterial protein toxins* (Aji, S. J., Kadis, S., Monte, T. C., eds.). Acad. Press, New York, p. 1—28.

VAN HEYNINGEN, W. E., 1974, *Les récepteurs des membranes cellulaires pour les toxines tétaniques et cholériques ou les délices de l'ignorance.* Bull. Inst. Pasteur, **72**: 433–464.
VAN HEYNINGEN, S., 1977, *Cholera toxin.* Biol. Rev., **52**: 509–549.
VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W., SCHRAA, G., ZEHNDER, A.J.B. 1987, *Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion.* Appl. Environm. Microbiol., **53**: 1 898 – 1 901.
VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W., ZEHNDER, A.J.B., 1989, *Bacterial adhesion : a physicochemical approach.* Microbiol. Ecol., **17**: 1–15.
VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W., ZEHNDER, A.J.B., 1990, *Influence of interfaces on microbial activity* Microbiol. Rev., **54**: 75–87.
VAN DER PLANK, J. E., 1967, *Spread of plant pathogens in space and time.* 17 Symposium of the Society for General Microbiology "Airborne microbes" (Gregory, P.H., Monteith, J.L., eds.). Cambridge Univ. Press, p. 227–246.
VALEN, L.V., 1971, *The history and stability of atmospheric oxygen.* Science, SUA **171**: 439–443.
VALLENTYNE, J. R., 1963. *Environmental biophysics and microbial ubiquity.* Ann. New York Acad. Sci., **108**: 342–352.
VAN VEEN, W. L., 1973, *Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria* Antonie van Leeuwenhoek, **39**: 189–205.
VAN VEEN, W. L., VAN DER KOOIJ, D., GEUZE, E.C.W.A., VAN DER ULIES, A. W., 1973, *Investigations on the sheated bacterium Haliscomenobacter hydrossis gen n. sp. n. isolated from activeted sludge.* Antonie van Leeuwenhoek, **39**: 207–216.
VICUNA, R., GONZALEZ, B., OLAVE, I., RUTTIMANN, C., SAPAG, A., SEELEN FREUND D., 1987, *Degradation of lignin related substrates by natural bacterial isolates.* În : *Lignin enzymic and microbial degradation* (Odiem E., ed.). Inra, Paris, p. 231–236.
VISHNIAC, W., 1971, *Limits of microbial productivity in the ocean.* Symposia of the Society for General Microbiology, 21 "Microbes and biological productivity". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 355–366.
VAN DER WAAIJ, D., 1989, *The ecology of the human intestine and its consequences for outgrowth by pathogens such as Clostridium difficile.* Ann. Rev. Microbiol., **43**: 69–87.
WALKER, N., 1975, *Microbial degradation of plant protection chemicals.* În : *Soil microbiology* (Walker, N., ed.). Butterworths, Londra, p. 181–192.
WALKER, N., 1975, *Nitrification and nitrifying bacteria.* În : *Soil microbiology* (Walker, N., ed.). Butterworths, Londra, p. 133–146.
WALLEN, V. R., 1964, *Host parasite relations and environmental influences in seed-borne diseases.* Symposia of the Society for General Microbiology, 14 „Microbial behaviour „in vivo" and „in vitro". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 187–212.
WALTERS, D. R., 1985, *Host : root interrelationships : the effects of obligately biotrophic fungal pathogens.* Biol. Rev., **60**: 47 – 79.
WALSH, J. H., 1968, *Ecological considerations of biodeterioration.* Int. Biodet. Bull., **4**: 1 – 10.
WARDELL, J. N., BROWN, C. M., FLANNIGAN, B., 1983, *Microbes and surfaces.* Symposia of the Society for General Microbiology. 34 „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 351–378.
WARNER, A.C.I., 1962, *Some factors influencing the rumen microbial population.* J. Gen. Microbiol., **28**: 129–146.
WARNER, A.C.I., 1962, *Enumeration of rumen microorganisms.* J. Gen. Microbiol., **28**: 119–128.
WARNER, A.C.I., 1964, *Production of volatile fatty acids in the rumen : methods of measurement.* Nutrition Abstr. Rev., **34**: 339–352.
WAYNEWILCOX, W., 1970, *Anatomical changes in wood cell walls attacked by fungi and bacteria.* The Botanical, Rev., **36**: 1–28.
WEBLEY, D. M., MOIRA, E. K., HENDERSON, E. K., TAYLOR, I.F., 1963, *The microbiology of rocks and weathered stones.* J. Soil Sci., **14**: 102–112.
WEILER, E. W., SCHRODER, J., 1987, *Hormone genes and crown gall disease.* Trends Biochem. Sci., **12**: 271–276.
WEINSTOCK, B., NIKI, H., 1972, *Carbon monoxide balance in nature.* Science, SUA, **176**: 290–292.
WEISS, E., 1982, *The biology of rickettsiae.* Ann. Rev. Microbiol. **36**: 345–370.
WELKER, N. E., 1976, *Microbial endurance and resistance to heat stresses.* Symposia of the Society for General Microbiology, 26 „The survival of vegetative microbes". Cambridge, Univ. Press, p. 241–272.
WELLS, C. L., 1990, *Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria.* Antonie van Leeuwenhoek, **58**: 87–93.

WENT, J.-C., DE JONG, F., 1966, *Decomposition of cellulose in soil*. Antonie van Leeuwenhoek, **32**: 39—56.

WENT, F. W., STARK, N., 1968, *The biological and mechanical role of soil fungi*. Proc. Natl. Acad. Sci., **60**: 497—504.

WESTPHAL, O., 1975, *Bacterial Endotoxins*. Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol., **49**: 1—43.

WHEELER, H., LUKE, H. H., 1963, *Microbial toxins in plant disease*. Ann. Rev. Microbiol., **17**: 223—242.

WHITACRE, D. M., ROAN, C.C., WARE, G. W., 1972, *Pesticides and aquatic microorganisms*. Search, **3**: 150—157.

WHITE, D. C., 1983, *Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments*. Symposia of the Society for General Microbiology, 35 „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 37—66.

WHITELEY, H. R., SCHNEPF, H. E., 1986, *The molecular biology of parasporal crystal body formation in Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol., **40**: 549—576.

WHITTAKER, R. H., 1972, *Communities and ecosystems*. Macmillan Co., Londra.

WHITTAKER, R. H., LEVIN, S. A., ROOT, R. B., 1973, *Niche, habitat and ecotop*. The Amer. natur., **107**: 321—338.

WILDE, S. A., 1968, *Mycorrhizae : their role in tree nutrition and timber production*. Res. Bull. Univ. Wisconsin, 1—30.

WILLIAMS, R.E.O., 1967, *Spread of airborne bacteria pathogenic for man*. 17, Symposia of the Society for General Microbiology „Airborne microbes" (Gregory, P. H., Monteith, J. L., eds.). Cambridge Univ. Press, p. 268—286.

WILLIAMS, J. M., SILVER, S., 1984, *Bacterial resistence and detoxification of heavy metals*. Enzyme Microb. Technol., **6**: 530—537.

WILLIAMS, A. G., 1986, *Rumen holotrich ciliate protozoa*. Microbiol. Rev., **50**: 25—49.

WILSON, G. S., 1957, *The selective action on bacteria of various factors inside and outside the animal body, with partial reference to their effect on virulence*. Symposia of the Society for General Microbiology. 7 „Microbial Ecology". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 338—363.

WILSON, B. J., 1966, *Toxins other than aflatoxins produced by Aspergillus flavus*. Bacteriol. Rev., **30**: 478—484.

WILSON, B. D., 1984, *Osmotic shock*. In: *Repairable lesions in microorganisms*. Acad. Press, Londra, p. 217—236.

WIMPENNY, J.W.T., 1981, *Spatial order in microbial ecosystems*. Biol. Rev., **56**: 295—342.

WIMPENNY, J.W.T., LOVITT, R. W., COOMBS, J. P., 1983, *Laboratory model systems for the investigation of spirally and temporally organised microbial ecosystems*. Symposia of the Society for General Microbiology. 34 „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 67—118.

WIRSEN, C. O., JANNASCH, H. W., 1974, *Microbial transformations of some $^{14}C$-labeled substrates in coastal water and se iment*. Microbiol. Ecol., **1**: 25—37.

WISEMAN, R. F., 1965, *Gnotobiotics and the germ-free animal*. Bioscience, **15**: 187—189.

WISEMAN, G. M., 1975, *The hemolysins of Staphylococcus aureus*. Bacteriol. Rev., **39**: 317—344.

WOGAN, G. N., 1966, *Chemical nature and biological effects of the aflatoxins*. Bacteriol. Rev., **30**: 460—470.

WOLIN, M. J., 1980, *Biogeochemical cycles : their complexity and their importance in the mineralization of wastes*. In: *Microbiology — 1980* (Schlessinger, D., ed.). Amer. Soc. Microbiol., New York, p. 350—351.

WOOD, J. M., 1974, *Biological cycles for toxic elements in the environment*. Science (S.U.A), 1 049 — 1 052.

WOODCOCK, D., 1964, *Microbial degradation of synthetic compounds*. Ann. Rev. Phytopathol., **2**: 321—340.

WOODWARD, C. R., MC NAMARA, T. F., 1970, *Microbiological consideration of cosmetic emulsions*. Amer. Perf. Cosm., **3**: p. 1—5.

WOODWELL, G. M., 1967, *Toxic substances and ecological cycles*. Sci. Amer., **216**: 24—31.

WRIGHT S.J.L., 1971, *Degradation of herbicides by soil microorganisms*. In: *Microbial aspects of pollution* (Sykes, G., Skinner, F.A., eds.). Acad. Press, New York, p. 233—254.

YATES, T. G., 1986, *How microorganisms move through water*. Sci. Amer., **74**: 358—365.

YOUSTEN, A. A., 1984, *Bacillus sphaericus : microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide*. Adv. Biotechnol. Processes, **3**: 315—343.

ZAMFIR, G., 1979, *Efectele unor poluanți și prevenirea lor*. Edit. Academiei, București.
ZARNEA, G., LEU, M., 1967, *Probleme actuale ale microbiologiei petroluluti*, Petrol și gaze, **18**: 527—530.
ZARNEA, G., 1970, *Microbiologie generală*. Edit. Didactică și Pedagogică, București.
ZARNEA, G., 1983, *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, Edit. Academiei, București.
ZARNEA, G., 1984, *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, Edit. Academiei, București.
ZARNEA, G., 1986, *Tratat de microbiologie generală*, vol. III. Edit. Academiei, București.
ZARNEA, G., 1990, *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, Edit. Academiei, București.
ZARNEA, G., GAVRILĂ L., 1989, *Biomecanica celulei*. În: *Biomecanica*. Edit. Academiei, București, p. 16—29.
ZEIKUS, J. G., 1981, *Lignin metabolism and the carbon cycle*: *Polymer biosynthesis, biodegradation and environmental recalcitrance*. Adv. Microbiol., Ecol., **5**: 211—243.
ZEIKUS, J. G., 1983, *Metabolic communication between biodegradative populations in nature*. Symposia of the Society for General Microbiology. 34 „Microbes in their natural environments". Cambridge, Univ. Press, Londra, p. 423—462.
ZoBELL, C. E., BECKWITH, J. D., 1944, *The deterioration of rubber products by microorganisms*. J. Amer. Water Works Assoc., **36**: 439—453.
ZoBELL, C. E., 1945, *The role of bacteria in the formation and transformation of petroleum hydrocarbons*. Science (S.U.A.), **102**: 364—369.
ZoBELL, C. E., 1946, *Action of microorganisms on hydrocarbons*. Bacteriol. Rev., **10**: 3—49.
ZoBELL, C. E., 1946, *Functions of bacteria in the formation and accumulation of petroleum*. The Oil Weekly, **277**: 1—8.
ZoBELL, C. E., 1952, *Part played by bacteria in petroleum formation*. Sediment. Pathology, **22**: 42 — 49.
ZoBELL, C. E., 1963, *Domain of the marine microbiologist*. În: *Symposium on marine microbiology* (Oppenheimer, C. H., ed.). C. C. Thomas Publ., S.U.A., p. 3—24.
ZoBELL, C. E., 1963, *The origin of oil*. Internat. Sci. Technol., August: 42—48.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Redactor: ECATERINA GHICA
Tehnoredactor: AUREL BUDNIC

*Bun de tipar: 18.07.1994. Format: 16/70 × 100. Coli de tipar: 67,5. Planşe: 18. C.Z. pentru biblioteci mari: 578.8(021)=59. C.Z. pentru biblioteci: mici: 57*

S. C. „UNIVERSUL" SA—c. 757

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973-27-0443-3
973-27-0439-X

Lei 5000